



TESIS DOCTORAL

**OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO INTENSIVO
DE ALMEJA FINA, *Ruditapes decussatus*
(LINNAEUS, 1758), EN CRIADERO**

Memoria presentada por **José Andrés Aranda Burgos** para optar al grado de Doctor

José Andrés Aranda Burgos

Programa de Doctorado en Ciencias Marinas, Tecnología y Gestión

INSTITUTO DE ACUICULTURA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2017



Dorotea Martínez Patiño, Doctora en Biología e Investigadora del Centro de Investigacións Mariñas de Ribadeo (Consellería do Mar - Xunta de Galicia), **Fiz da Costa González**, Doctor en Biología y miembro del Equipo de Selección Genética de Oceano Fresco Lda., y **José Luís Sánchez López**, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular del Instituto de Acuicultura (Universidad de Santiago de Compostela),

INFORMAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “**Optimización del cultivo intensivo de almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), en criadero**”, presentada por D. José Andrés Aranda Burgos para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada en el Centro de Investigacións Mariñas bajo su dirección y tutela, y que reúne los requisitos exigidos en el artículo 33 del Reglamento de Estudios de Doctorado de la Universidad de Santiago de Compostela. Hallándose concluida, autorizan su presentación y defensa.

Y para que así conste, firman los presentes en Ribadeo, a 31 de agosto de 2017

Fdo. Dra. Dorotea Martínez Patiño
Directora de la Tesis Doctoral

Fdo. Dr. Fiz da Costa González
Codirector de la Tesis Doctoral

Fdo. Dr. José Luís Sánchez López
Codirector y Tutor de la Tesis Doctoral



Este trabajo ha sido desarrollado en el Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo (CIMA) de la Consellería do Mar de la Xunta de Galicia y financiado por los siguientes proyectos y ayudas:

- Programa de Recursos Humanos del Plan Galego de Investigación, Desenvolvemento e Innovación Tecnolóxica (PGIDIT), según convocatoria de becas para la formación de personal especialista en temas de investigación marina (Orden del 28 de diciembre de 2007, DOG nº11).
- Proyecto de Investigación “Optimización del cultivo intensivo de la almeja e identificación de marcadores genéticos para el seguimiento de las repoblaciones” incluido en el Plan Nacional de Cultivos Marinos (JACUMAR).



Por el momento, parte de este trabajo ha sido publicado en forma de tres artículos científicos y dos capítulos en un libro:

1. **Aranda-Burgos, J.A.**; da Costa, F.; Nóvoa, S.; Ojea, J. & Martínez-Patiño, D. 2014. Embryonic and larval development of *Ruditapes decussatus* (Bivalvia: Veneridae): A study of the shell differentiation process. *Journal of Molluscan Studies*, 80: 8-16.
2. **Aranda-Burgos, J.A.**; da Costa, F.; Nóvoa, S.; Ojea, J. & Martínez-Patiño, D. 2014. Effects of microalgal diet on growth, survival, biochemical and fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* larvae. *Aquaculture*, 420: 38-48.
3. Dubert, J.; da Costa, F.; **Aranda-Burgos, J.A.**; Martínez-Patiño, D.; Prado, S. & Barja, J.L. 2016. Beneficial effects of carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) depuration during short periods of conditioning in shellfish hatchery: Role of the temperature and phytoplankton on reduction and diversity of vibrios. *Aquaculture*, 459: 65-72.

4. da Costa, F.; **Aranda-Burgos, J.A.**; Cerviño-Otero, A.; Louzán, A.; Nóvoa, S.; Ojea, J. & Martínez-Patiño, D. Clam hatchery and nursery culture in Spain. En: Clams: anatomy, habitat and ecological significance. Da Costa, F. (ed.). Nova Publishers. 2012.

5. da Costa, F.; **Aranda-Burgos, J.A.**; Cerviño-Otero, A.; Louzán, A.; Nóvoa, S.; Ojea, J. & Martínez-Patiño, D. Clam reproduction. En: Clams: anatomy, habitat and ecological significance. Da Costa, F. (ed.). Nova Publishers. 2012.







“En este gran futuro no puedes olvidar tu pasado”

Bob Marley.



A Iri, Noa, “Garbancito”, Papá, Mamá e Iván.



AGRADECIMIENTOS

Me alegra profundamente que este sea el primer apartado en el que os vais a detener. Para terminar una tesis es imprescindible encontrar ayuda, dejarte ayudar y agradecer esa ayuda, los dos primeros son comunes en el camino del conocimiento científico, el tercero, es vital. La gratitud en silencio no sirve a nadie.

En primer lugar, gracias a la Dra. Dorotea Martínez Patiño. Tea, gracias por todo. Me “recogiste” cuando el camino inicial se truncó. Me enseñaste y exigiste todo lo que necesitaba. Me calmaste y escuchaste cuando así lo requería. Y al final, me diste el último empujón para que no bajara del barco. ¡Por fin, hemos llegado a tierra!. Gracias, sin ti no lo hubiera conseguido.

Gracias al Dr. Fiz da Costa González. Fiz, por siempre te consideraré como mi mentor. Eres sencillamente único. Único porque nunca conocí una persona tan altruista como tú en el ámbito científico. Te apasiona lo que haces y ese es el mayor motivo por el que siempre estás ahí cuando se te necesita. Además, siempre recordaré los buenos momentos que pasé a tu lado trabajando, aprendiendo, compartiendo, charlando...

En este orden, gracias al Dr. José Luís Sánchez López. En estos tiempos de cambios académicos, tu ayuda ha sido imprescindible para poder recorrer los caminos burocráticos que preceden la finalización de una tesis.

Aunque resulte llamativo, y voy a explicar el porqué, gracias al año 2008. Este fue el año en el que llegué al Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo. Un lugar que, por y para siempre, permanecerá en mi interior. Y aunque el enclave es excepcional, sois vosotr@s los que lo habéis hecho inolvidable. Gracias a Susana y Justa, ilustres profesoras, compañeras y amigas. A Menel, qué pena no haberte conocido antes, me faltaron muchas más horas de conversación. A Conchita, Ana y Mercedes, siempre pendientes y dispuestas a ofrecer su ayuda. A Merchi, Javi, Vicky, M^a José, Escudero, compañer@s de criadero que sin darnos cuenta hacen que todo funcione, un placer haber trabajado y compartido con vosotr@s. Igual de sinceros son mis agradecimientos para todas las personas que pasaron por allí y que compartieron conmigo este trabajo,

Mari, Sari, Diana, Iria, Belén, Alex, Pol, Laura, Geni, María. Por último, gracias a Ana, Andrea y Jana, compañeras de tesis, maestras en muchos momentos, amigas, colegas y sobre todo, buena gente. Siempre os recordaré. Allá donde terminemos tod@s....mucho suerte y felicidad.

Sin embargo, este camino no empezó en 2008. Gracias a los doctores Alejandro Guerra, José Molares y José Manuel Parada, y a los compañer@s de Corón, en especial a Marité, Cholo, Gemma, Sergio y Maite. Gracias por echar una mano cuando no había dirección ni rumbo.

Mención especial merece el departamento de microbiología de la USC. Muchas gracias a los doctores Susana Prado y Juan Barja por su enorme colaboración y enseñanzas, pero en especial, muchas gracias al Dr. Javier Dubert, sin tu ayuda desinteresada en los últimos años no hubiera podido terminar la tesis. Tampoco quiero olvidarme de Inés, Suso y el personal del CACTI de Vigo, ni tampoco de las doctoras Josefina Méndez y Ana Ínsua de la Universidad de A Coruña.

Por último, quería agradecer a toda la gente que me rodea diariamente. Realmente, sois vosotr@s los mayores partícipes de que este trabajo, por fin, haya llegado a su término. Gracias a todos mis amigos y amigas, nuevos y viejos. Sois el aire que me permite respirar todos los días. Gracias a mi familia gallega, todavía no entiendo cómo me queréis tanto. Gracias a mi familia madrileña y mañica. Allí nací, allí crecí y sobre todo, allí me enseñasteis quién quiero ser.

Ahora sí, ya termino. Pero no puedo rematar esta faena sin nombrar a aquellas personas a las que les debo algo más que la tesis. Andrés y Nieves, lo más bonito que me ha pasado desde que decidí estudiar Biología fue vivir con vosotros tres años. Gracias por ser mis abuelos. Espero que cuando me toque a mí, sepa hacerlo tan bien como vosotros. Gracias a Víctor. Primo, fuiste, eres y serás una de las personas que más ha confiado en mí. No te puedes hacer a la idea todo lo que me has enseñado. Y sobre todo, gracias a José, Ana e Iván. Papá, mamá, tato, nunca tendré tiempo suficiente para encontrar las palabras con las que agradeceré todo, pero siempre tendréis todo mi tiempo. Os quiero a tod@s.

Pero si hay alguien a quien le debo algo más que unas palabras de agradecimiento es a Iria. Chuliña, has estado desde el comienzo de este viaje a mi lado. Has sonreído cuando yo estaba triste. Has andado cuando yo estaba cansado. Has pensado cuando yo divagaba, pero sobre todo, me has querido como nadie lo había hecho antes. Gracias por ayudarme a terminar este viaje, y gracias por comenzar a mi lado el otro gran viaje de mi vida. Te quiero.

Noa y “Garbancito”, a partir de ahora sois mi nueva tesis. Mucho camino nos queda por delante, pero si algún día leéis esto recordad esta máxima: “Conservar lo que tenéis, olvidar lo que os duele, luchar por lo que queréis, valorar lo que poseéis, perdonar a los que os hieren y disfrutar de los que os aman”.

Y una vez más, a todos y todas, GRACIAS.

Curro.





RESUMEN

La almeja fina (*Ruditapes decussatus*) es la especie de almeja autóctona más apreciada en Galicia. Desde el comienzo, el desarrollo de su cultivo ha estado ligado principalmente a la abundancia de reclutamiento de semilla en el medio natural, pero factores como la sobreexplotación a la que fueron sometidos los bancos naturales, la entrada de otras especies de bivalvos alóctonas que compiten por el hábitat y distintas patologías como la infección por el parásito *Perkinsus* sp., han dado lugar a la práctica desaparición de algunos de ellos, lo que ha supuesto una reducción importante en las capturas. A pesar de todo el esfuerzo, tanto técnico como económico, que se ha destinado a optimizar la producción de semilla de esta especie en los criaderos, las cifras de producción siguen siendo muy reducidas, fundamentalmente debido a episodios de mortalidades masivas que acaban con toda la producción en pocos días. El objetivo de este manuscrito es describir y desarrollar puntos importantes de la biología y el cultivo de la almeja fina, con el fin de optimizar su producción intensiva en criadero. Para ello, se van a estudiar tres aspectos básicos como son: la embriología y el desarrollo larvario; la alimentación larvaria y la búsqueda de dietas óptimas durante su cultivo; y por último, la microbiota asociada al desarrollo gonadal durante el acondicionamiento de los reproductores.

Palabras clave: *Ruditapes decussatus*, cultivo larvario, alimentación, acondicionamiento, microbiología.

RESUMO

A ameixa fina (*Ruditapes decussatus*) é a especie de ameixa autóctona máis apreciada en Galicia. Desde o comezo, o desenvolvemento do seu cultivo estivo ligado principalmente á abundancia de recrutamento de semente no medio natural, pero a sobreexplotación á que foron sometidos os bancos naturais, a entrada doutras especies de bivalvos alóctonas que compiten polo hábitat, así como distintas patoloxías como a infección polo parasito *Perkinsus* sp., deron lugar á práctica desaparición dalgúns deles, o que supuxo unha redución importante nas capturas. A pesar de todo o esforzo, tanto técnico como económico, que se destinou a optimizar a produción de semente desta especie nos criadeiros, as cifras de produción seguen sendo moi reducidas,

fundamentalmente debido a episodios de mortalidades masivas que acaban con toda a produción en poucos días. O obxectivo deste manuscrito é describir e desenvolver puntos importantes da bioloxía e o cultivo da ameixa fina, co fin de optimizar a súa produción intensiva en criadeiro. Para iso, vanse a estudar tres aspectos básicos como son: a embrioloxía e o desenvolvemento larvario; a alimentación larvaria e a procura de dietas óptimas durante o seu cultivo; e por último, a microbiota asociada ao desenvolvemento gonadal durante o acondicionamento dos proxenitores.

Palabras chave: *Ruditapes decussatus*, cultivo larvario, alimentación, acondicionamiento, microbioloxía.

ABSTRACT

The grooved carpet shell (*Ruditapes decussatus*) is the most appreciated species of native clam in Galicia. From the beginning, the development of their culture has been mainly related to the abundance of seed recruitment in the natural environment, but the overexploitation to which the natural banks have been subjected, the entry of other competing foreign species of bivalve by the habitat, as well as different pathologies such as infection by the parasite *Perkinsus* sp., resulted in the practical disappearance of some of them, which meant a significant reduction in catches. Despite all the technical and economic efforts made to optimize the production of seed of this species in the hatcheries, the production figures are still very small, mainly due to episodes of massive mortalities that end up with all production in a few days. The aim of this manuscript is to describe and develop important points of biology and culture of this species, in order to optimize their intensive production in hatchery. To do this, three basic aspects will be studied: embryology and larval development; larval feeding and the search for optimal diets during their culture; and finally, the microbiota associated with gonadal development during broodstock conditioning.

Keywords: *Ruditapes decussatus*, larval culture, conditioning, feeding, microbiology.





Índice





ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Taxonomía.....	3
Hábitat y distribución geográfica	5
Anatomía y fisiología.....	7
Anatomía externa	7
La concha	7
Anatomía interna.....	10
El manto.....	10
Los músculos aductores.....	12
El pie	12
Las branquias y el aparato respiratorio	12
Aparato digestivo.....	14
Aparato excretor	15
Sistema circulatorio	16
Sistema nervioso y órganos de los sentidos.....	16
Reproducción y sistema reproductor	17
Producción e importancia económica	21
En Europa y África.....	21
En España.....	23
En Galicia	24
OBJETIVOS.....	31
EMBRIOLOGÍA Y DESARROLLO LARVARIO	33
Introducción.....	35
Material y métodos.....	39
Inducción a la puesta y fertilización	39
Cultivo larvario.....	40
Visionado en el microscopio óptico.....	41
Toma de muestras y procesado para microscopía electrónica de barrido	41
Toma de muestras y procesado para microscopía electrónica de transmisión	43
Resultados.....	45
Discusión	64
ALIMENTACIÓN LARVARIA	71
Introducción.....	73
Metabolismo de los ácidos grasos en bivalvos marinos.....	80
Material y métodos.....	84
Cultivo de microalgas.....	84
Acondicionamiento de reproductores e inducción a la puesta.....	86
Cultivo larvario.....	87
Análisis bioquímicos	88
Recogida y procesado de muestras	88

Extracción y determinación de lípidos totales.....	89
Determinación de proteínas totales.....	92
Determinación de carbohidratos totales.....	94
Análisis de ácidos grasos.....	94
Recogida y procesado de muestras.....	94
Determinación y cuantificación de ácidos grasos.....	95
Análisis estadístico.....	98
Resultados.....	100
Crecimiento y supervivencia larvaria.....	100
Composición bioquímica y de ácidos grasos de las dietas ensayadas.....	100
Composición bioquímica y de ácidos grasos de las larvas.....	102
Lípidos neutros.....	102
Lípidos polares.....	104
Variaciones de los AG a lo largo del cultivo larvario en los lípidos neutros y polares.....	107
Relación entre el crecimiento, la supervivencia y la composición bioquímica y de ácidos grasos.....	109
Discusión.....	114
Efectos de las dietas microalgales en el desarrollo larvario de las larvas de <i>R. decussatus</i>	114
Efectos de la composición bioquímica y de ácidos grasos de las microalgas sobre el perfil bioquímico y de ácidos grasos de las larvas de <i>R. decussatus</i>	115
MICROBIOLOGÍA ASOCIADA AL ACONDICIONAMIENTO	123
Introducción.....	125
Microbiota bacteriana en los cultivos de bivalvos en criadero: influencia de los vibrios.....	125
Acondicionamiento de reproductores desde un punto de vista microbiológico.....	127
Material y métodos.....	129
Diseño del acondicionamiento y muestreo de los reproductores.....	129
Prueba 1 (mayo – junio 2011).....	129
Prueba 2 (mayo – junio 2012).....	130
Inducción a la puesta, obtención de gametos y transformación a larva D.....	131
Análisis histológicos. Determinación del sexo y del estado de desarrollo gonadal (EDG).....	132
Análisis microbiológicos.....	133
Análisis estadísticos.....	135
Resultados.....	136
Carga bacteriana de los reproductores.....	136
Prueba 1 (mayo – junio 2011).....	136
Prueba 2 (mayo – junio 2012).....	139
Cambios en la población de <i>Vibrio</i> spp. de los reproductores acondicionados... ..	143
Prueba 1 (mayo – junio 2011).....	143
Prueba 2 (mayo – junio 2012).....	144
Inducción a la puesta, obtención de gametos y transformación a larva D.....	147

Discusión	148
CONCLUSIONES	155
Embriología y desarrollo larvario	157
Alimentación larvaria	157
Microbiología asociada al acondicionamiento	158
BIBLIOGRAFÍA	161
ANEXOS: PUBLICACIONES.....	191





Capítulo I

Introducción general





TAXONOMÍA

La sistemática de los taxones superiores de bivalvos se basaba hasta hace muy pocos años en dos criterios: por un lado el de los paleontólogos, que establecían la clasificación en función de la morfología de la concha, particularmente en la dentición de la charnela y en las impresiones musculares; y, por otro lado, el de los anatomistas, que fundamentaban la clasificación en los caracteres de la anatomía, principalmente de la estructura de las branquias. Esencialmente, todas las clasificaciones de organismos, tanto a nivel de especie como de grandes grupos taxonómicos, se han basado en el uso de estos análisis anatómicos y/o morfológicos, dada la evidente correlación entre forma y evolución. Sin embargo, el desarrollo de las técnicas de biología molecular en las últimas décadas, ha supuesto un nuevo salto cualitativo para el mundo de la sistemática, dadas las enormes posibilidades que estas técnicas ofrecen, estudiando el último nivel de variabilidad biológica; la variabilidad genética.

Para esta tesis se ha optado por utilizar la clasificación de Brands (1989-2005), que resume bastante bien las tendencias actuales:

Phylum	Mollusca (C. Linnaeus, 1758) (Cuvier, 1795- molluscs)
Clase	Bivalvia (C. Linnaeus, 1758). También se conoce como clase Lamellibranchiata , Pelecypoda y/o Conchifera
Subclase	Heterodonta (Neumayr, 1884). También se conoce como subclase Metabranhia
Infraclasse	Euheterodonta (Giribet, 2008)
Superorden	Imparidentia (Bieler, Mikkelsen & Giribet, 2014)
Orden	Venerida (Gray, 1854)
Superfamilia	Veneroidea (Rafinesque, 1815)
Familia	Veneridae (Rafinesque, 1815)
Subfamilia	Tapetinae (Gray, 1851)
Género	Ruditapes (Chiamenti, 1900). También son aceptados los géneros Tapes (Chiamenti, 1900) y/o Venerupis (Chiamenti, 1900)
Especie	Ruditapes decussatus (Linnaeus, 1758)

La almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), es un molusco perteneciente a la clase **Bivalvia** (también conocida como clase Lamellibranchiata y/o

Pelecypoda). Los bivalvos se diferencian del resto de los moluscos en varios aspectos; están comprimidos lateralmente y presentan simetría bilateral. Su cuerpo está protegido por dos valvas laterales que permanecen unidas dorsalmente por un ligamento elástico y engranadas por unos dientes que constituyen la charnela. Estas valvas se pueden abrir y cerrar por la acción combinada del ligamento y de los dos músculos aductores, de los cuales el anterior puede faltar o estar reducido. El manto forma dos grandes expansiones laterales cuyos bordes pueden estar más o menos soldados, y delimita una amplia cavidad paleal donde se encuentran dos grandes branquias laminares (razón por la que a los integrantes de este taxon también se les conoce como lamelibranquios). Las branquias, además de realizar el intercambio gaseoso, intervienen en la selección del alimento. El pie, generalmente comprimido en sentido lateral, tiene habitualmente forma de hacha, debido a lo cual también se les llama pelecípodos. La cabeza está muy reducida: carecen de tentáculos cefálicos, mandíbulas, rádula y faringe, por cuyo motivo también se les denomina acéfalos. En general son micrófagos y la mayoría son excavadores de fondos blandos.

La subclase **Heterodonta** o **Metabbranchia** es la más grande y diversa de todas las subclases de bivalvos, con numerosas especies que poseen las más variadas formas y estructuras. Dentro de esta subclase encontramos la infraclase **Euheterodonta**, y a su vez, dentro de ésta se encuentra el superorden **Imparidentia**. Este superorden lo forman nueve órdenes, de los cuales, el orden **Venerida** es sin duda el más amplio, incluyendo 13 superfamilias. La superfamilia **Veneroidea** está subdividida en once familias, entre las que destaca la familia **Veneridae**. Esta familia comprende en Galicia algunas especies de almejas autóctonas: la almeja fina (*Ruditapes decussatus*), almeja babosa (*Venerupis corrugata* - Gmelin, 1791) y almeja rubia (*Polititapes rhomboides* - Pennant, 1777).

HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

R. decussatus (Linnaeus, 1758), es un molusco bivalvo, bentónico infaunal y suspensívoro, que **habita** en substratos de arena gruesa limpia o mezclada con cascajo. Actualmente, también se puede encontrar en substratos algo fangosos debido al cambio progresivo de la naturaleza de los fondos de nuestras rías. Preferentemente ocupa la zona intermareal, aunque también se pueden encontrar en bancos submareales. Es una especie euriterma (5-30°C) y eurihalina (10-50‰) variando los umbrales de tolerancia según la situación geográfica (Parache, 1982). Su talla varía mucho dependiendo de la temperatura del agua y de la disponibilidad de fitoplancton, pero en Galicia suele alcanzar la talla comercial (40 mm en su eje mayor) al cabo de tres o cuatro años.

La **distribución geográfica** de esta especie, al igual que ocurre con el resto de los bivalvos, está determinada por sus límites de tolerancia a las variaciones de cada uno de los factores ambientales. Estas variaciones afectan a su supervivencia, éxito reproductivo y capacidad de continuar creciendo e interactuando con el entorno.



Figura I. 1.- Distribución geográfica de *R. decussatus* (Elaboración propia. Fuente Google earth).

La almeja fina es una especie sensible a cambios en las condiciones medioambientales, entre los que destaca la subida de las temperaturas y la bajada de salinidad, aunque éste último es menos problemático para esta especie que para las otras dos especies autóctonas.

Así pues, el rango de distribución de la almeja fina (Fig. I. 1) *R. decussatus*, se extiende desde el Mar del Norte hasta las costas de Senegal (Gharbi *et al.*, 2010) y desde las Azores, a través del Atlántico y del Mediterráneo, hasta el Canal de Suez y Mar Rojo (Gerard, 1978). Está presente en todo el litoral atlántico europeo, incluyendo el Mar del Norte y el Canal de la Mancha, y en toda la cuenca mediterránea (Argelia, Túnez, Italia, Grecia y Egipto) con excepción del Mar Negro (Ojea, 2013).

En algunas zonas su presencia es meramente testimonial, sin embargo, hay países y regiones donde sus poblaciones constituyen un recurso de gran valor local, llegando incluso a generarse nombres comunes o vernáculos de uso más extendido y coloquial para referirse a esta especie. A continuación se citan algunos de ellos.

Español	Almeja fina
Inglés	Grooved carpet shell
Francés	Palourde croisée d'Europe
Portugués	Amêijoa-boá
Italiano	Vongola verace
Gallego	Ameixa fina, femia
Catalán	Cloïsa
Euskera	Txirla handia

ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA

Anatomía externa

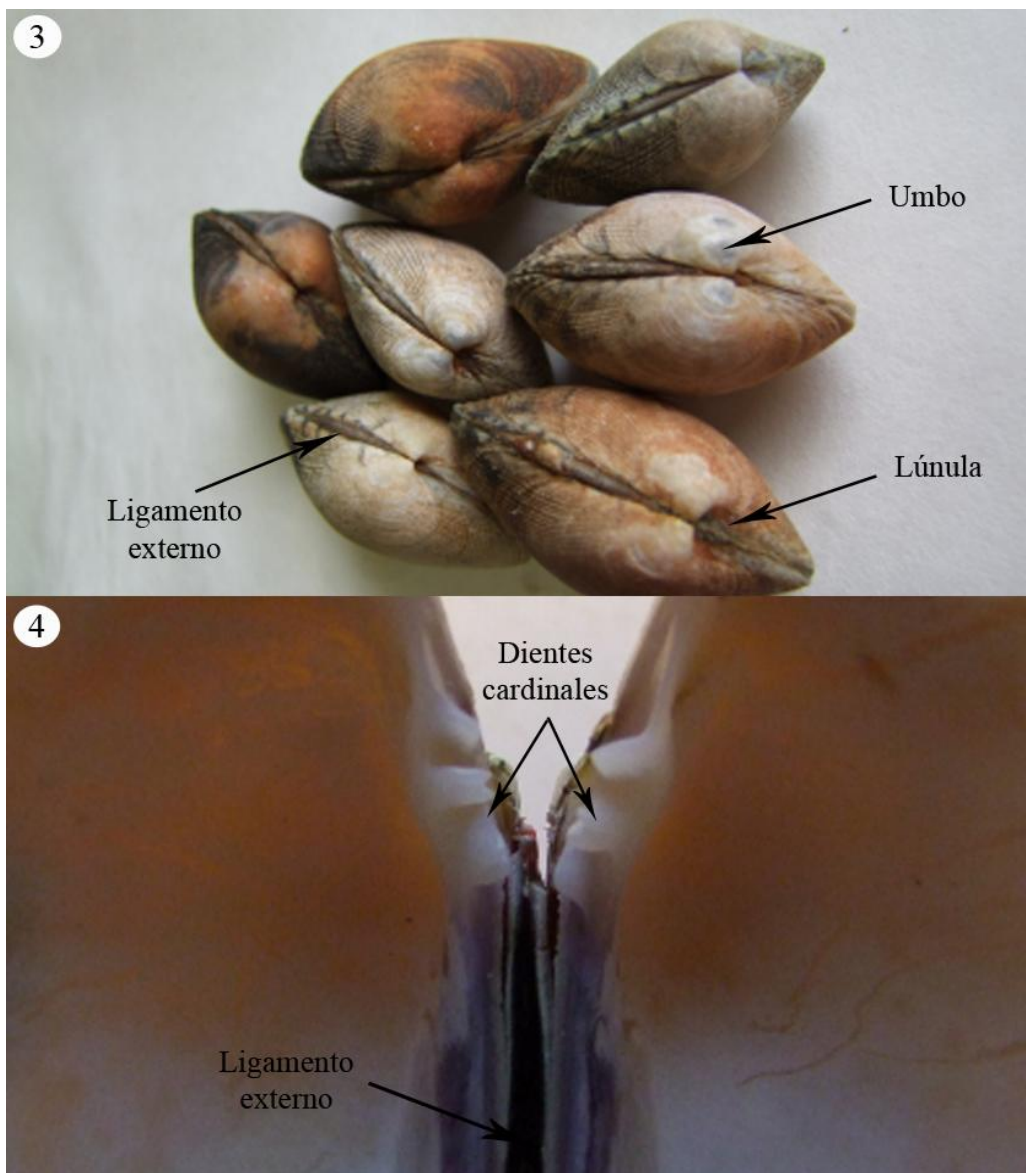
La concha

La concha de los bivalvos está formada por capas calcáreas recubiertas por un periostraco de naturaleza orgánica (conquiolina). En general, el **periostraco** es una capa delgada y su función es múltiple, además de proteger a las capas calcáreas subyacentes, contribuye al hermetismo de las valvas cuando se cierran, e interviene en la formación de la propia concha. Las capas calcáreas están constituidas por una mezcla de calcita y aragonito y, en su conjunto, forman un estrato prismático de aspecto mate. La capa calcárea más interna es la **capa nacarada**. La formación de la concha se debe a la acción secretora del pliegue externo del manto; la superficie interna de este pliegue produce el periostraco, y la superficie externa secreta la primera capa calcárea prismática. Las restantes capas calcáreas se forman a partir del epitelio superior de la



Figura I. 2.- Superficie externa de la concha de la almeja fina, en la cual se pueden observar estrías concéntricas y líneas radiales o “costillas”. Su coloración puede variar en función del sustrato en el que habita.

superficie del manto. Entre el manto y la concha, con excepción de las áreas de inserción muscular, existe un estrechísimo espacio extrapaleal, donde se van depositando los materiales secretados que engrosarán la concha.



Figuras I. 3-4.- 3. Vista apical de la región dorsal de la concha de almeja fina. 4. Zona de la charnela con dientes cardinales.

La almeja fina, al igual que el resto de representantes de la familia Veneridae, presenta una concha que la caracteriza, y que está formada por dos **valvas** similares entre sí (equivalva), una derecha y otra izquierda y articuladas por su región dorsal. Sin embargo, si se tiene en cuenta su simetría con relación al plano transversal que pasa por

los umbos, las valvas de la almeja fina son inequiláteras. La superficie externa de las valvas (Fig. I. 2) presenta finas estrías concéntricas y líneas radiales más marcadas. Esta ornamentación le confiere un tacto rugoso con surcos poco profundos.

Cada valva posee dorsalmente una prominencia convexa llamada **umbo** (Fig. I. 3), que es la parte más vieja de la concha; está brevemente espiralizado y termina en una cúspide aguda dirigida hacia la parte anterior del animal denominada ápice, en el que a menudo se conserva la prodisoconcha, o primera concha larvaria. A continuación del umbo, en la parte anterior, encontramos la lúnula (Fig. I. 3) que es una zona ovalada, algo hundida y que puede servir como un carácter diferenciador con la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*), ya que en esta última es de color oscuro, mientras que en la almeja fina es clara mantiene el mismo patrón de coloración que el resto de la concha.

El borde por donde se abren las valvas determina la parte ventral y el área dorsal de la articulación de las dos valvas se denomina charnela, y en esta especie se trata de una **charnela de tipo heterodonta**, la cual se caracteriza por presentar dientes muy desiguales entre sí (Fig. I. 4). La valva derecha posee 3 dientes cardinales agudos y comprimidos en posición lateral, siendo el de la parte anterior pequeño y simple, mientras que los otros 2 son más grandes y bífidos. En la valva izquierda, también se pueden observar 3 dientes, el anterior es más saliente, el que está en posición central es más grueso y bífido, y el último es estrecho y débil. Además de los dientes, ambas valvas presentan unas fosetas donde encajan los dientes cardinales de la valva opuesta.

Dorsalmente las dos valvas están unidas por un **ligamento externo** (Fig. I. 3-4), formado por una proteína elástica. El ligamento está constituido por dos capas, una laminar externa y otra interna fibrosa y funcionan de tal manera que cuando las valvas están cerradas, la capa laminar se estira mientras que la capa fibrosa se comprime. Las valvas se cierran por la acción de los músculos aductores, cuya acción es antagónica a la del ligamento; así, cuando estos músculos se relajan, la elasticidad natural del ligamento hace que las valvas se abran.

En la cara interna de las valvas (Fig. I. 5), tanto los músculos aductores como el músculo paleal del borde del manto, dejan impresiones musculares a modo de cicatriz. Por un lado, se distingue una marca denominada **línea o impresión paleal**, que va

desde el borde inferior de la impresión de un músculo aductor al otro, describiendo una curva paralela al borde ventral de la concha. Además, esta línea paleal presenta una marcada escotadura denominada **seno paleal** que representa el lugar donde se insertan los músculos retractores de los sifones, y que en el caso de esta especie, es muy profunda debido al gran tamaño de los mismos, en comparación con otras especies de almejas. Estos dibujos ornamentales son específicos y definitorios de la especie.

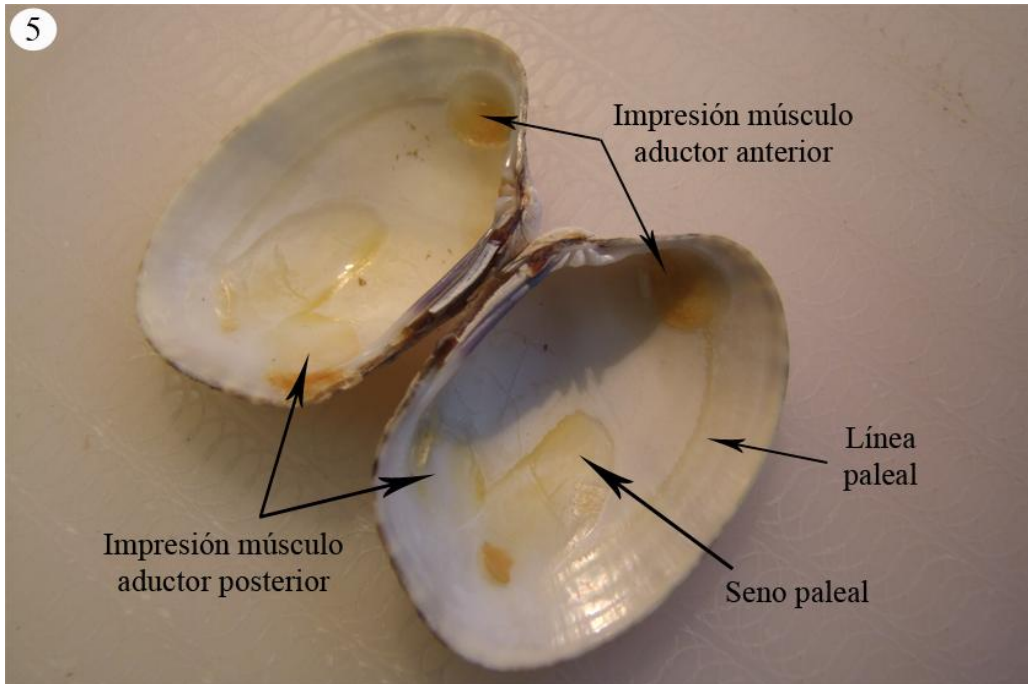
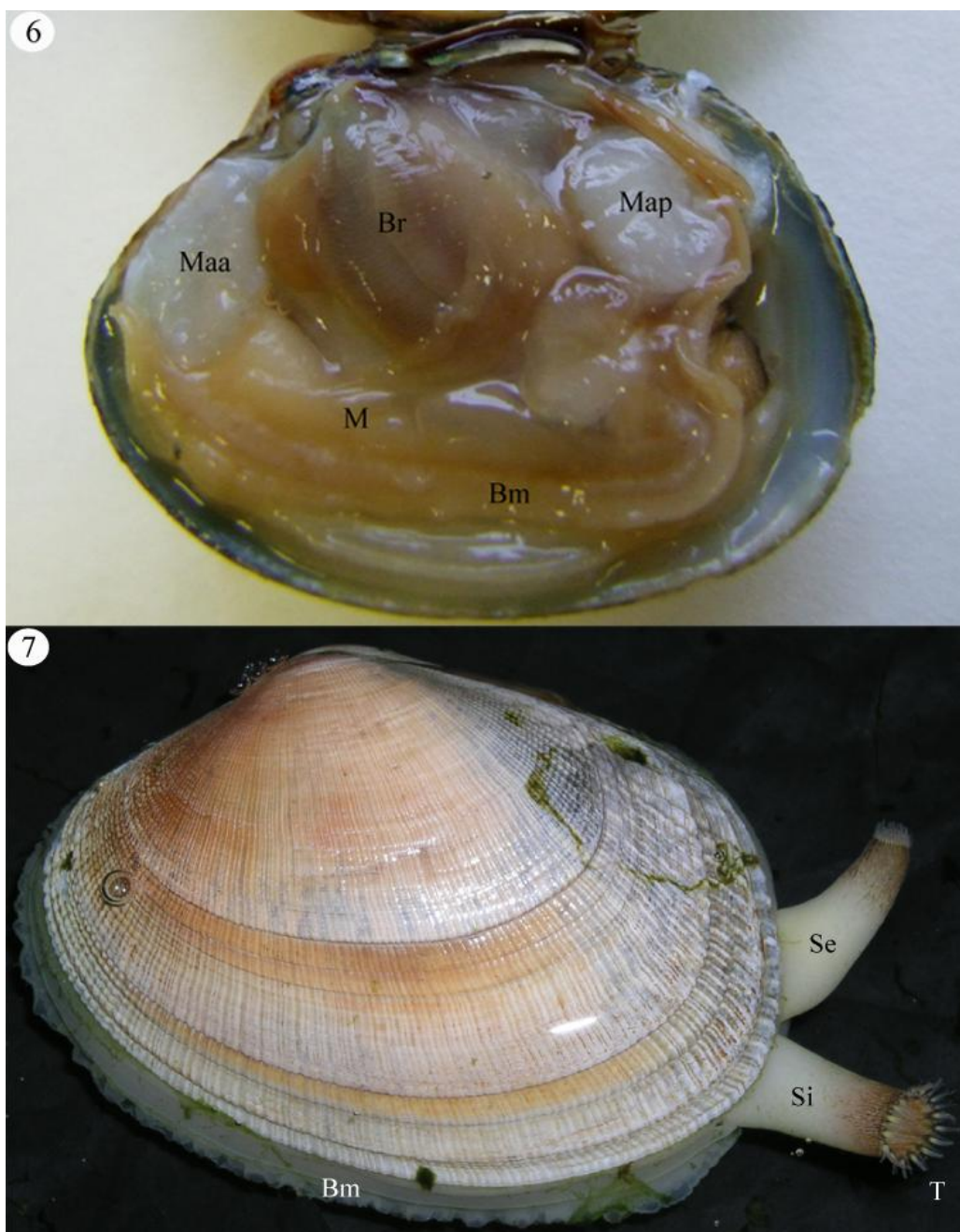


Figura I. 5.- Superficie interna de la concha de la almeja fina. Se observan las impresiones musculares a modo de “cicatriz” que dejan los músculos aductores y el borde del manto.

Anatomía interna

El manto

El manto es el tegumento que protege a las partes blandas, se encuentra adherido a la cara interna de las valvas e interviene en su formación. Se halla adherido a la región dorsal y se extiende lateralmente, partiendo de la base de las branquias, en **dos lóbulos** delgados, uno derecho y otro izquierdo, delimitando la cavidad paleal (Fig. I. 6). En los **bordes del manto** se distinguen tres pliegues: uno interno, provisto de músculos paleales mediante los cuales se fija a la concha dejando marcada la línea paleal; un lóbulo medio, con funciones sensoriales, que en el caso de esta especie, se distingue bien en el borde de los sifones en forma de tentáculos (Fig. I. 7); y un lóbulo externo



Figuras I. 6-7.- 6. Anatomía interna de la almeja fina. Cubriendo las partes blandas se observa uno de los lóbulos del manto. 7. Almeja fina “*in vivo*” mostrando los sifones extendidos y el borde del manto. Abrev.: Bm: borde del manto; Br: branquias; M: manto; Maa: músculo aductor anterior; Map: músculo aductor posterior; Se: sifón exhalante; Si: sifón inhalante; T: tentáculos de los sifones.

con funciones secretoras, encargado de la formación de la concha. Además de estas funciones sensoriales y secretoras, el manto también cumple otros propósitos, como son, controlar la entrada de agua en la cavidad corporal y dirigir las partículas alimenticias hacia las branquias. Los **sifones** son dos conductos que se forman al unirse

los dos lóbulos del manto en la parte posterior del cuerpo, y que sirven para controlar la entrada (sifón inhalante) y salida (sifón exhalante) de agua en la cavidad paleal. En la almeja fina, a diferencia de las otras especies de almejas autóctonas de Galicia, los sifones están totalmente separados, siendo independientes uno del otro (Fig. I. 7).

Los músculos aductores

Poseen dos músculos aductores del mismo tamaño (**isomíarios**), uno anterior y otro posterior, situados debajo de cada extremo de la charnela, en la cara interna de las valvas, y dejan en ese lugar una impresión muscular característica. Su función es cerrar la concha mediante su acción, antagónica a la del ligamento (Fig. I. 6).

El pie

El pie es un órgano musculoso y móvil, situado anteroventralmente en relación con la masa visceral (Fig. I. 8). Puede retraerse en el interior de la concha por la acción de una musculatura que le da una gran movilidad. Es un órgano utilizado para la locomoción y la excavación, para lo cual produce una serie de contracciones seguidas por períodos de relajamiento. En la base de este órgano, los estadios postlarvarios y juveniles poseen un conjunto de células que se especializan en la **glándula del bisco**, y que secretan un filamento proteico que le permite fijarse al sustrato, ya que se endurece en contacto con el agua.

Las branquias y el aparato respiratorio

A cada lado del cuerpo, en la cavidad paleal, la almeja fina tiene una branquia **biplectinada o ctenidio** (Fig. I. 8). Están unidas a la base de la masa visceral por una estrecha banda membranosa llamada eje branquial. Cada branquia consiste esencialmente en dos filas longitudinales de **filamentos branquiales**. Los filamentos están recubiertos por cilios que se imbrican unos en otros manteniéndolos unidos. En los **lamelibranquios**, en general, y en la almeja fina, en particular, la sección transversal de la branquia tiene forma de “W” debido a que los filamentos además de incrementar su número, se alargan y se doblan, lo que incrementa notablemente su área superficial. De esta manera, cada filamento branquial está compuesto por dos láminas: una basal descendente unida al eje branquial y otra distal ascendente dirigida hacia el

manto o hacia la masa visceral. Todas estas interconexiones otorgan a la branquia un aspecto laminar, de donde deriva el nombre de lamelibranquios. En la zona de plegamiento de los filamentos se encuentran unas entalladuras que se continúan unas con las otras, formando los surcos alimenticios por los que conducen el alimento hasta la boca. Las branquias de la almeja fina, las denominadas **eulamelibranquias**, son en las que las uniones entre los filamentos están muy desarrolladas, formando láminas continuas de tejido que dejan unos orificios u ostiolos para el paso del agua.

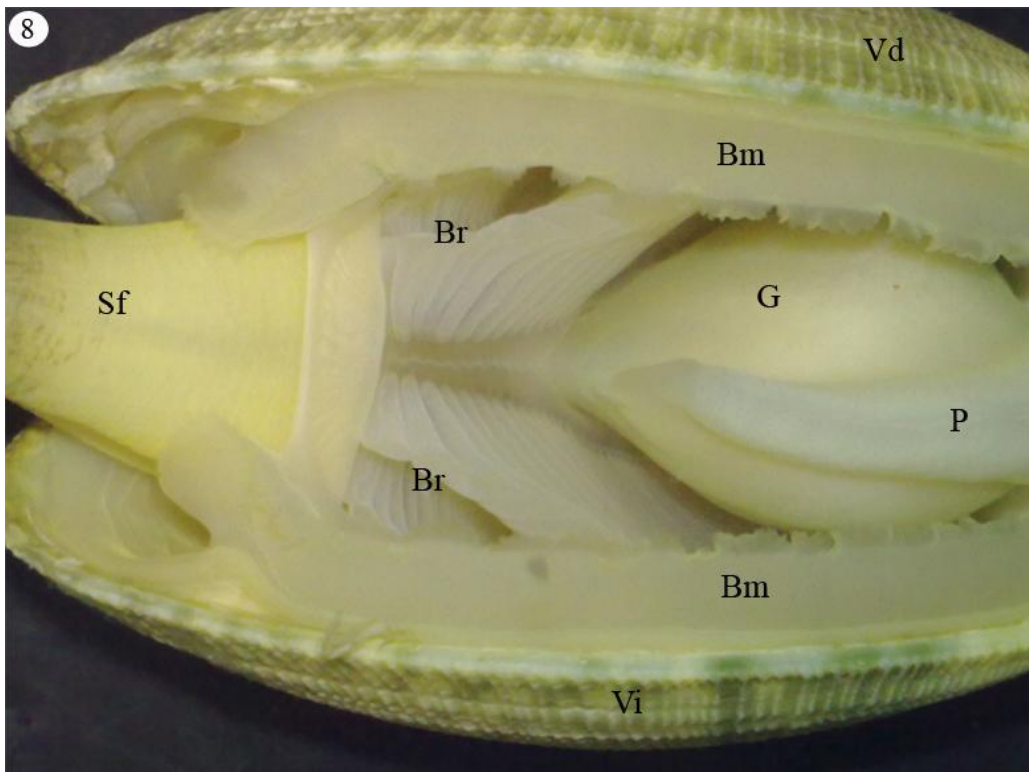


Figura I. 8.- Visión ventral de una almeja fina “*in vivo*” en la que se observan las branquias a ambos lados de la gónada. Abrev.: Bm: borde del manto; Br: branquias; G: gónada; P: pie; Sf: sifones; Vd: valva derecha; Vi: valva izquierda.

Los bivalvos filtradores como la almeja fina, transformaron las branquias en filtros para aprovechar el alimento que entra en la cavidad paleal con la corriente inhalante y adaptaron los cilios, de limpieza branquial, para transportar hasta los palpos labiales y la boca, las partículas alimenticias retenidas en el mucus branquial, constituyéndose así como **órganos de filtración** del material alimenticio. Las partículas de alimento que no son rechazadas, son envueltas en una sustancia mucosa y conducidas, gracias al movimiento de los cilios branquiales, hacia la parte posterior del animal, donde se encuentran los palpos labiales y la boca. Las partículas rechazadas, por

su tamaño o por su composición bioquímica, se aglutinan en la cavidad paleal formando las pseudoheces, expulsadas al exterior por el sifón exhalante.

Aparato digestivo

Comienza en la **boca**, situada en la parte anterior del cuerpo, cuyos bordes se continúan a ambos lados por dos pares de **palpos labiales** (Fig. I. 9), a los que llega el alimento seleccionado y transportado por las corrientes ciliares de las branquias, y que se utilizan para llevar el alimento hasta la boca. La boca se continúa en un corto **esófago**, que a su vez desemboca en la parte anterodorsal del **estómago**. Éste es una dilatación situada entre las aberturas del esófago y del intestino, cuyas paredes están plegadas. En el estómago, además, se abren los conductos procedentes de los divertículos digestivos, y en él desemboca el **estilo cristalino** (Fig. I. 10), que se aloja en el **saco del estilo** y que está unido al estómago.

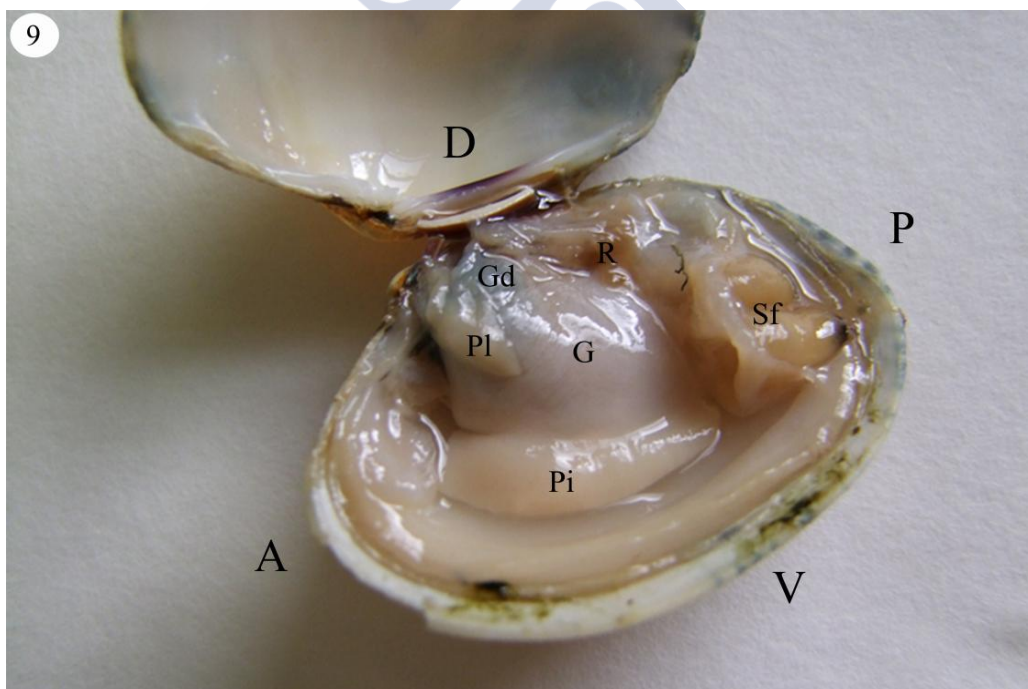


Figura I. 9.- Anatomía interna de la almeja fina en la que se ha retirado el lóbulo del manto y la branquia del lado derecho. Abrev.: A: parte anterior; D: parte dorsal; G: gónada; Gd: glándula digestiva; P: parte posterior; Pi: pie; Pl: palpo labial; R: riñón; Sf: sifones; V: parte ventral.

El estilo cristalino es recto, rematado con un extremo anterior en forma de gancho o anzuelo y de color amarillento o translúcido, aunque su color va a depender del color de la alimentación. El extremo anterior se encuentra dentro del estómago y

roza contra una placa cuticular y denticulada de la pared del estómago, denominada **escudo gástrico**. Su función consiste en triturar el alimento al girar sobre sí mismo contra el escudo gástrico. Participa en la mezcla del alimento y en la digestión extracelular en el estómago, además de por su rotación, también porque ejerce una acción química sobre el alimento, ya que contiene enzimas que va liberando.



Figura I. 10.- Estilo cristalino de la almeja fina.

La **glándula digestiva** es una masa de divertículos gástricos que rodea al estómago (Fig. I. 9), formada por un gran número de túbulos terminados en vesículas glandulares. Su color es marrón-verdoso. La función de los túbulos es digestiva: realizan la digestión intra y extracelular, al producir enzimas digestivas, así como el de la absorción. El **intestino** es un tubo largo, con ciliatura dorsal. En su trayectoria atraviesa la cavidad cardíaca y desemboca en el **ano** situado debajo del músculo aductor posterior y muy cerca del sifón exhalante.

Aparato excretor

La almeja fina, así como el resto de los bivalvos, posee dos **nefridios** a cada lado del cuerpo, que se encuentran situados debajo de la cavidad pericárdica. Son conductos tubulares doblados en forma de “U” y con las paredes internas plegadas; en un extremo se abren en el pericardio formando el **nefrostroma**, y en el otro se encuentra el **nefridioporo** que desemboca en la cavidad paleal.

El líquido pericárdico se forma por la ultrafiltración del plasma sanguíneo a través de la pared cardíaca; este líquido es arrastrado dentro de los nefridios por la acción de los cilios del embudo del nefrostoma y en el conducto tubular nefridial vascularizado sufre una reabsorción selectiva a través de sus paredes. En las paredes del pericardio se encuentran las **glándulas pericárdicas** u **órganos de Keber**, de color pardusco, rojizo o anaranjado; a través de estas glándulas se eliminan algunas sustancias.

Sistema circulatorio

Es un sistema simple y abierto, pero difícil de localizar, de gran importancia en el mecanismo del enterramiento. Posee un **corazón** dorsal encerrado en el pericardio y formado por un ventrículo, que rodea al recto, y dos aurículas laterales. La sangre o hemolinfa es impulsada a través de **dos aortas**, una anterior y otra posterior, que por las arterias y arteriolas distribuyen la sangre por las diferentes partes del cuerpo. La hemolinfa circula a través de lagunas tisulares y **senos**, de los que el más importante es el seno ventral localizado debajo del complejo renopericárdico. De este seno la mayor parte de la sangre es conducida al nefridio, donde se depura, y de ahí, por los vasos branquiales aferentes, va a las branquias, donde se oxigena, para retornar por los vasos branquiales eferentes a las aurículas del corazón. Además de este circuito sanguíneo principal, parte de la sangre recorre otros circuitos secundarios; así, una parte de la sangre que va al manto, donde también se produce intercambio gaseoso, retorna al corazón sin pasar por las branquias, directamente desde el manto o desde los nefridios. Al igual que la mayoría de los bivalvos, la almeja **carece de pigmento respiratorio**, posiblemente como consecuencia de la baja absorción de oxígeno en la branquia.

Sistema nervioso y órganos de los sentidos

El sistema nervioso en los bivalvos presenta simetría bilateral. Está formado por dos pares de **cordones nerviosos** y por tres pares de **ganglios** principales: los **cerebropleurales**, en posición supraesofágica; los **pedios**, situados en la base del pie; y los **viscerales**, localizados en las proximidades del músculo aductor posterior, ventralmente al tubo digestivo. De los ganglios cerebropleurales parten los dos pares de cordones nerviosos principales que se extienden hacia la parte posterior del cuerpo. El

primer par, conectivos cerebroviscerales, discurre entre las vísceras y termina en el par de ganglios viscerales. El segundo par de cordones, conectivos cerebropedios, se dirige ventralmente por el interior del pie y se une al par de ganglios pedios, que están fusionados.

Los ganglios cerebropleurales y los pedios controlan los movimientos del músculo aductor anterior y del pie, y los ganglios viscerales, del músculo aductor posterior y de los músculos de los sifones. La coordinación de los movimientos del pie y de las valvas depende de los ganglios cerebropleurales.

En *R. decussatus* destaca la presencia de **órganos sensoriales**, a modo de células táctiles, fotorreceptoras y quimiorreceptores, circunscritos a las aberturas de los sifones. Asimismo, existe un par de estatocistos situados en el pie e inervados por los ganglios cerebropleurales.

Reproducción y sistema reproductor

Como la mayoría de los bivalvos, la almeja fina es una especie **gonocórica** (sexos separados) y sin dimorfismo sexual. Poseen dos gónadas, que envuelven las asas intestinales, estando tan estrechamente unidas entre sí, que es difícil discernir su condición pareada. Así pues, la masa gonadal es una estructura difusa que en estado de reposo sexual, prácticamente desaparece, y en su fase de máximo desarrollo envuelve la glándula digestiva y demás órganos, ocupando toda la masa visceral (Fig. I. 8 y 9), extendiéndose entre los músculos y por todo el espacio ocupado por el tejido conjuntivo (Vilela, 1950).

Las **gónadas** están formadas por una serie de **folículos** que comunican con una tupida red de canales secundarios, que se unen a su vez, en una serie de conductos principales o gonoductos. Los **gonoductos** son sencillos y carecen de células musculares, lo que obliga a que la expulsión de gametos se realice gracias al movimiento de los cilios que tapizan estos conductos (Iwata, 1952), desembocando en la cavidad paleal cerca de los nefridioporos.

La **gametogénesis**, o producción de gametos (ovogénesis y espermatogénesis) comienza cuando las gonias (células germinales primordiales) se diferencian en ovogonias y espermatogonias. Ambos tipos celulares son diploides y se dividen repetidamente por mitosis para originar en las hembras ovocitos primarios y en los machos espermatoцитos primarios. Los **ovocitos** primarios sufren una primera división meiótica en dos fases: fase previtelogénica, en el que los ovocitos, adheridos a la pared interna del folículo, aumentan de tamaño pero no se observa acumulación de sustancias de reserva; y la fase vitelogénica, en la que el ovocito crece más rápidamente porque ya acumula en su citoplasma sustancias de reserva. Al final del proceso de maduración, el ovocito se separa de la pared del folículo y migra hacia el lumen donde permanece hasta el desove. En este momento el ovocito es completamente redondo y presenta un diámetro de 67,5 μm , aproximadamente (Aranda-Burgos, 2010). La segunda división meiótica ocurre una vez que se ha producido la fecundación del ovocito.

Los **espermatoцитos** primarios, más pequeños que las espermatogonias de las que proceden, sufren la primera división meiótica resultando la aparición de los espermatoцитos secundarios, que quedan libres en los folículos formando una banda concéntrica sobre la capa de espermatogonias (Sastry, 1979). A diferencia de la ovogénesis, estos espermatoцитos entran rápidamente en la segunda división meiótica formando las espermátidas. Tras una serie de reorganizaciones celulares, las espermátidas se transforman en espermatozoides que se disponen de forma radial hacia el lumen del folículo.

A lo largo del ciclo reproductivo se suceden distintos estadios de desarrollo gametogénico que cambian la apariencia macroscópica y microscópica de la gónada. La almeja fina de Galicia presenta un ciclo anual sincrónico en el que se diferencian dos fases distintas: una fase de reposo o recuperación durante el invierno (octubre-diciembre) y otra de actividad gametogénica que incluye la madurez y el desove en el verano (Pérez-Camacho, 1980; Rodríguez-Moscó, 2000; Ojea, 2013). Esta estrategia reproductiva también coincide con la encontrada para la misma especie en la costa de la Bretaña francesa (Beninger y Lucas, 1984). Sin embargo, si analizamos lo que ocurre en otros países mediterráneos, observamos alguna diferencia sobre todo, en la presencia o no de la fase de reposo. Por ejemplo, en Turquía, Serdar *et al.* (2010) observaron que el estado de reposo sólo se encontraba en el 3-5% de la población estudiada en los meses

de noviembre a enero. De la misma manera, Smaoui-Damak *et al.* (2007), estudiando el ciclo natural de una población de almeja fina en Túnez, observaron que no existía un período de reposo como tal, ya que la gónada mostraba actividad durante todo el año, aunque ésta disminuía en meses como enero y febrero.

La mayoría de las almejas pertenecientes a la familia Veneridae suelen desovar en la época estival, aunque se pueden encontrar variaciones inter e intraespecíficas (Shafee y Daoudi, 1991). Algunos trabajos apuntan a que estas diferencias intraespecíficas pueden tener su respuesta en las variaciones de temperatura que se suceden a lo largo de su distribución, así Laruelle *et al.* (1994) revisaron los patrones reproductivos de la almeja fina a lo largo de su rango de distribución geográfica y concluyeron que la temperatura tiene un efecto positivo en la gametogénesis y que puede afectar directamente en la tasa metabólica del animal, o indirectamente en la disponibilidad de alimento ya que la máxima tasa de incremento en peso ocurre durante la primavera, cuando ambos factores, temperatura del mar y presencia de alimento, aumentan considerablemente.

Tanto las hembras como los machos, fabrican en sus gónadas unas sustancias químicas llamadas **fertilisinas y antifertilisinas**, respectivamente, y que expulsan con sus productos sexuales, induciendo así, la emisión de gametos en los machos y la liberación de ovocitos en las hembras, lográndose de esta manera una sincronización en la emisión de los gametos. A su vez, el esperma una vez en el agua, también favorece que se desencadene la puesta en las hembras. Se ha demostrado que el sistema nervioso interviene en el desove, la ablación de los ganglios cerebroides la activa y adelanta, mientras que la ablación de los ganglios viscerales la retarda o inhibe totalmente (Grassé, 1985).

La **fecundación** es externa y ocurre al azar. El desarrollo larvario es indirecto, es decir, las larvas van transformándose en diferentes estadios de vida planctónica, hasta alcanzar la metamorfosis, momento en el que pasan de vivir de forma libre en el plancton, a adoptar un comportamiento de vida bentónico y propio de esta especie (Fig. I. 11).

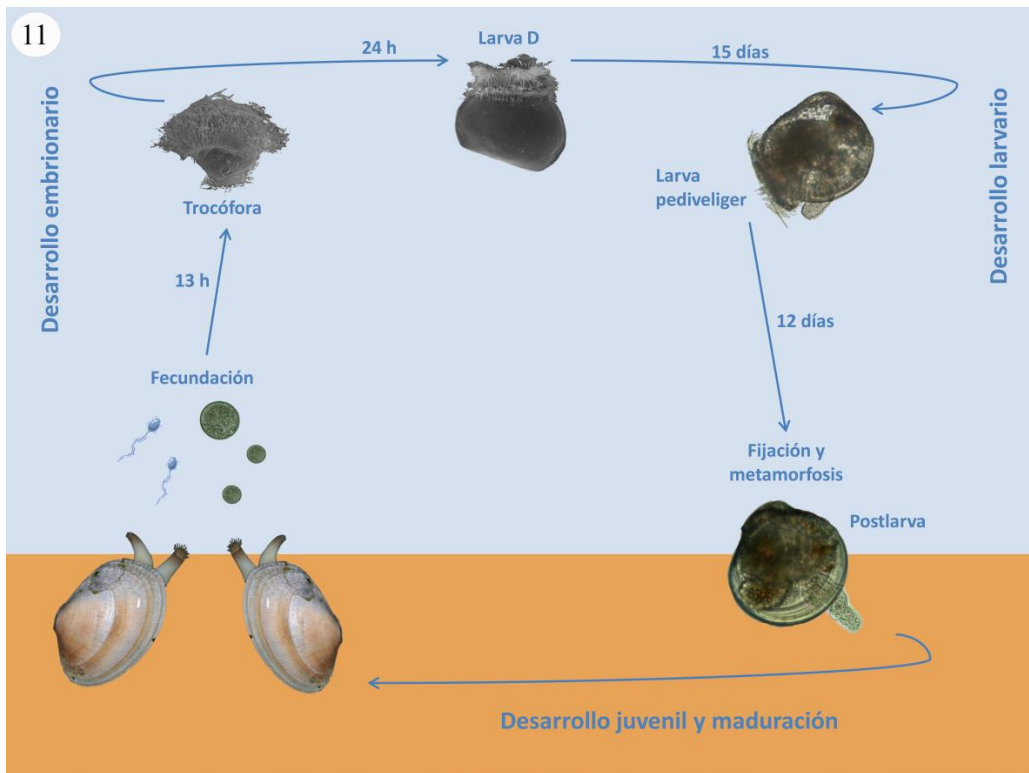


Figura I. 11.- Ciclo vital de *R. decussatus*.



PRODUCCIÓN E IMPORTANCIA ECONÓMICA

La importancia económica de los moluscos bivalvos a nivel global está fuera de toda duda. En 2010, los bivalvos representaron el 12,3% del total de la producción mundial (capturas más producción de acuicultura). Según datos de la FAO, la producción mundial de moluscos bivalvos ha aumentado considerablemente en los últimos sesenta años, pasando de casi dos millones de toneladas en 1950 a unos 24 millones de toneladas en 2014.

En Europa y África

Según los datos de capturas de la almeja fina, *Ruditapes decussatus*, publicados por la FAO (Fig. I. 12), hay registros de descargas desde 1950 en Europa y el norte de África. A pesar de que los datos estadísticos de la FAO no siempre reflejan la situación real de una especie, pudiéndose encontrar diferencias con otras fuentes consultadas de carácter más local, sí que proporcionan una visión aproximada de la realidad en las capturas y la producción acuícola de esta especie. Así, se observa que desde entonces hasta la década de los años 80, el principal país en número de toneladas fue España, representando siempre un porcentaje, sobre el total de capturas, mayor del 80%. Sin embargo, a partir del año 1982 y hasta 1994, Portugal aparece como el país que mayores capturas presenta, destacando el trienio que va de 1991 hasta 1993, en el que la producción portuguesa fue superior a las 8.000 Tm, llegando incluso en 1992 a las 15.000 Tm. A partir de entonces, el grupo de países que contabilizaron capturas de almeja fina se amplía, apareciendo los primeros datos en países como Reino Unido, Irlanda y especialmente, Francia y Túnez. Sin embargo, en los últimos veinticinco años, las capturas de esta especie han sufrido un acusado descenso, sobre todo en España y Portugal.

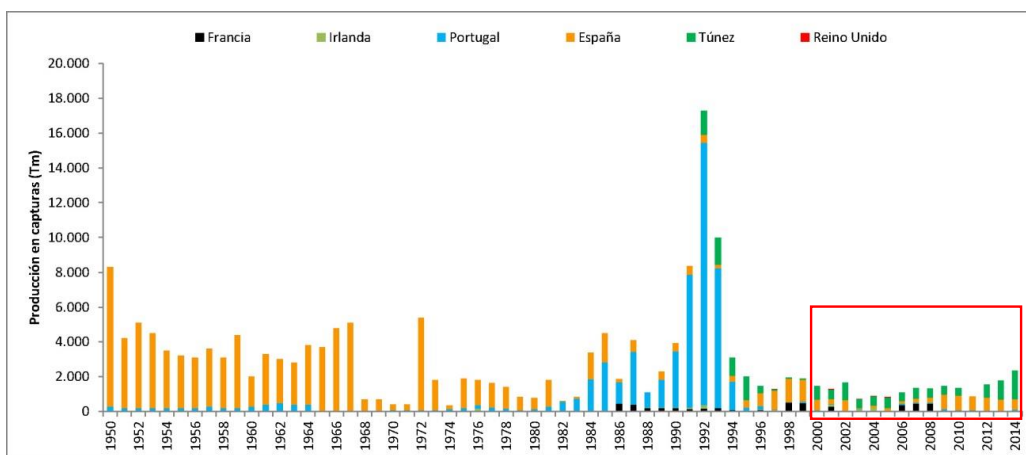


Figura I. 12.- Estadísticas de producción de la almeja fina en Europa y África desde 1950 hasta 2014. El cuadro rojo señala la escala temporal que se detalla en esta figura.

Para analizar la situación actual, vamos a centrarnos en los datos disponibles sobre las capturas de almeja fina desde el año 2000 hasta el año 2014. Como podemos ver en la figura I. 13, el total de capturas de esta especie se ha estabilizado en torno a las >1.000-2.500 Tm, siendo España y Túnez los máximos productores en este sentido. Estas cifras suponen un claro descenso con respecto a los datos históricos para esta especie, hecho que confirma la regresión de los bancos naturales.

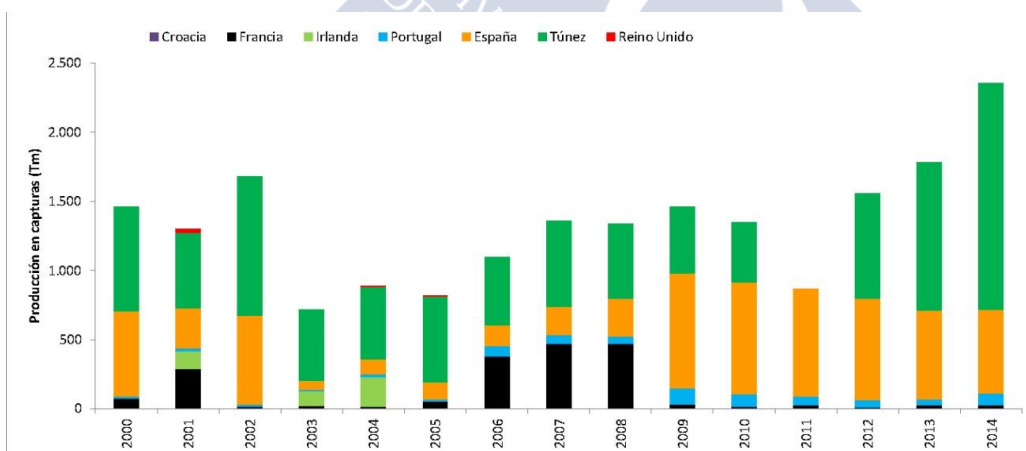


Figura I. 13.- Estadísticas de producción de la almeja fina en Europa y África desde el año 2000 hasta el 2014.

Hasta este momento, al hablar de producción en Europa y África, únicamente hemos considerado las capturas en el medio natural, pero no debemos olvidar las procedentes de la acuicultura, cuya importancia ha aumentado progresivamente desde su inicio. En la figura I. 14 se pueden observar todos los registros que hay hasta la

actualidad, publicados por la FAO, y que van desde comienzos de los años 80 hasta 2014.

Cuantitativamente, la producción en acuicultura de esta especie ha ido ganando importancia desde sus comienzos, así hasta que en 1994, la producción acuícola global superó la obtenida de la extracción en el medio natural, y desde ese momento, esta tendencia se ha mantenido durante las dos últimas décadas hasta llegar a 2014 (último registro), año en el que la producción global de almeja fina mediante acuicultura, superó en casi el doble a la producción natural (4.002 Tm y 2.355 Tm, respectivamente).

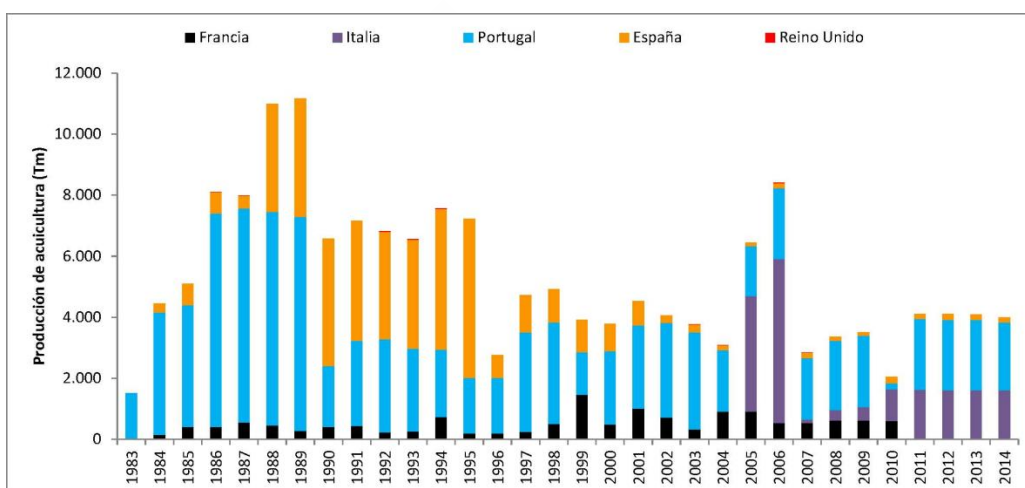


Figura I. 14.- Estadísticas de producción en acuicultura de la almeja fina en Europa.

En España

Aunque las capturas de esta especie en España se distribuyen principalmente en dos áreas de pesca; el Atlántico y el Mediterráneo, la mayor parte proceden de las costas gallegas (en especial de las Rías Baixas). Según datos de la FAO, el volumen de capturas de almeja fina en España durante el año 2014, considerando las procedentes del medio natural así como las de acuicultura, fue de 773 Tm, es decir el 12% de la producción mundial.

Sin embargo, un análisis más profundo de estos datos nos muestra una realidad diferente, dependiendo si nos referimos a la producción natural o a la producción acuícola. Según los últimos datos registrados, en el año 2014 España fue el segundo país en capturas de almeja fina en el medio natural (Fig. I. 13), con un 26% de la

producción mundial, sin embargo, si hablamos de la producción en acuicultura, España es el tercer país con sólo un 4% de la producción acuícola mundial (Fig. I. 14).

En Galicia

Con una línea de costa que alcanza 1.195 Km entre la desembocadura del Río Eo (provincia de Lugo) y la del Río Miño (provincia de Pontevedra), el litoral gallego cuenta con un total de 278 arenales y 70 millones de metros cuadrados de zona intermareal. Si a ello añadimos las excelentes características geográficas y biotípicas de las rías, relativamente poco profundas, con escaso oleaje, y sometidas al fenómeno del “afloramiento” marino y al sistema de circulación estuárica, estamos ante unas condiciones óptimas para el cultivo de moluscos bivalvos (Mahou, 2008). No sorprende, por tanto, que se haya desarrollado en Galicia, desde ya hace muchos años, una potente actividad económica en torno al marisqueo.

En Galicia el marisqueo es una actividad socio-económica de primer orden, pues ocupa a unas 8.500 personas (Consellería do Mar, Xunta de Galicia). Se basa en la actividad extractiva, desarrollada a pie o desde embarcación, en la zona marítima o marítima-terrestre, dirigida exclusivamente y con artes selectivas, a la captura de especies de moluscos con fines comerciales. Si bien su generalización no ha sido totalmente alcanzada, podemos hablar actualmente del marisqueo como una actividad próxima a la acuicultura, al encontrarse en un momento de tránsito de lo que Odum y Odum (1976) denominan “sistema gestionado” a “sistema cultivado”, esto es, de un sistema en el que el recurso es explotado de acuerdo con una serie de normas y reglamentos de explotación, que limitan el esfuerzo de captura e institucionalizan el control y vigilancia administrativa (vedas, cupos de captura, licencias, limitaciones horarias, inspecciones, etc.), a un procedimiento que permite aplicar sobre el recurso gestionado técnicas de cultivo con el propósito de limitar o evitar problemas ecológicos y de sobreexplotación, y controlar finalmente el ciclo de las especies.

Los Planes Generales de Explotación son un conjunto de normas y orientaciones, de carácter anual, destinadas a regular y programar dicha extracción y recolección que sólo podrá ser ejercida por personas y embarcaciones con permiso de explotación. Estos Planes son aprobados por orden de la Consellería do Mar, después de

consultar con las entidades representativas del sector (Cerviño-Otero, 2011). En estos Planes se integran tanto los planes de explotación para autorizaciones marisqueras, como las normas y los planes específicos de explotación para zonas de libre marisqueo.

La captura y extracción de las almejas en Galicia está regulada según el artículo 114 del Decreto 424/93, en el cual se definen las artes de captura de los moluscos bivalvos. La almeja fina, por ser una especie que vive sobre todo en la zona intermareal, es mayoritariamente extraída mediante el marisqueo a pie, aunque también se pesca a flote, desde embarcaciones en los bancos submareales.



Figura I. 15.- Artes para extraer la almeja fina. Angazo (A). Mariscadora trabajando con el angazo (B). Raño (C). Mariscadora trabajando con el raño (D).

El marisqueo a pie se caracteriza por extraer el molusco, durante la bajamar, con un “sacho”, “angazo” o “fouciño”, si la zona queda completamente seca, o con un “rastros” o “raño”, si la zona queda cubierta por una capa de agua de poca profundidad

(Fig. I. 15). El marisqueo a flote, se efectúa en los bancos que están siempre sumergidos, y en los que además la profundidad dificulta su acceso a pie. Las artes empleadas en esta modalidad también son el “rastros” o “raño” y su uso es estrictamente manual porque está prohibido usar aparejos mecánicos para el arrastre sobre el fondo, y tampoco pueden ser remolcadas por la embarcación.

La almeja fina es la especie de almeja autóctona más apreciada en Galicia, alcanzando los valores más elevados en precio de venta en lonja y ocupando un lugar destacado en el sector marisquero. La producción anual de esta especie se mantuvo, hasta el año 2015, en valores que oscilaban entre las 500 y las 800 toneladas, siendo el bienio 2005-2006, los años menos productivos (Fig. I. 16). Sin embargo, destaca negativamente la caída de la producción de esta especie durante el 2016, año en el que sólo se obtuvieron 380 toneladas.

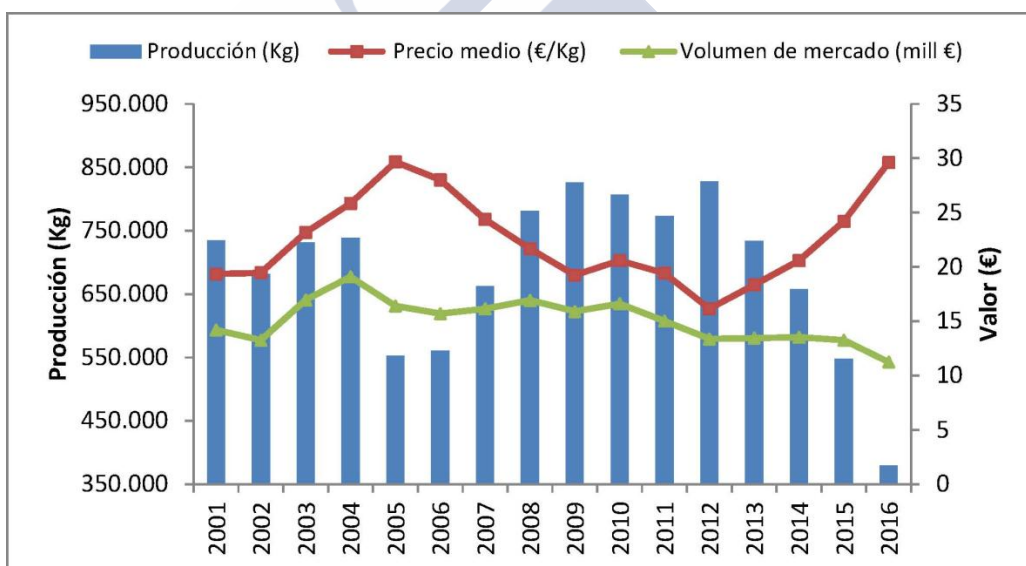


Figura I. 16.- Estadísticas de producción, precio medio alcanzado y volumen total de mercado de la almeja fina en las lonjas gallegas.

Teniendo en cuenta el volumen de mercado, cociente que relaciona las unidades vendidas y el precio alcanzado de las mismas, la almeja fina es la especie, de las cuatro especies de almejas más importantes en Galicia, que mayor volumen total de negocio y cotización global presenta durante lo que llevamos de siglo XXI, con 15,1 millones de euros anuales de media, frente a los 14,3 de la almeja babosa; 10,9 de la almeja japonesa y 3,9 de la almeja rubia (Fig. I. 17).

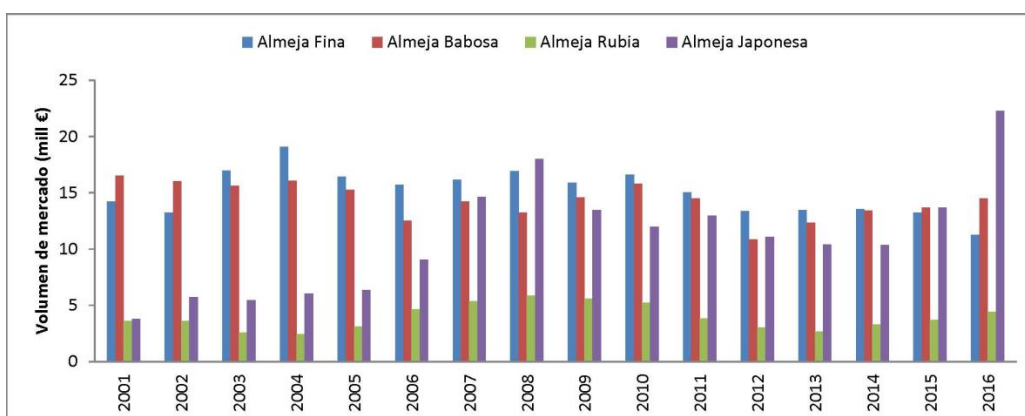


Figura I. 17.- Volumen total de mercado, de las cuatro especies de almejas más representativas, en las lonjas gallegas.

Desde un punto de vista más local, hasta 46 cofradías gallegas presentan registros de venta de almeja fina en sus lonjas durante este siglo. Aunque no todas tienen la misma importancia cuantitativa, ya que si nos centramos en las ocho cofradías que mayores cantidades movilizan, suponen alrededor del 80% del volumen total de venta. Estas lonjas son O Grove, Cambados, Illa de Arousa, Noia, Vilanova, Carril, Rianxo y Campelo, nombradas en orden de importancia durante el año 2016. La mayoría de las cuales, mantienen una producción estable durante los últimos años (Figura I. 18).

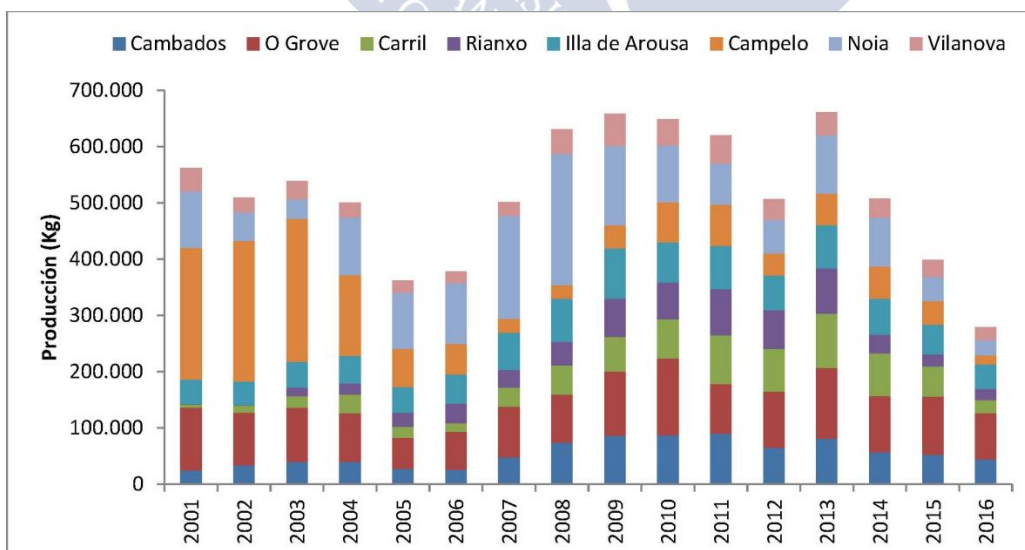


Figura I. 18.- Evolución de la producción de almeja fina para las ocho localidades gallegas actualmente con mayor producción.

Si bien tradicionalmente, la pesca de este molusco se encuadraba dentro de una actividad meramente extractiva y con marcadas fluctuaciones anuales relacionadas con la variabilidad ambiental y capacidad organizativa, en las últimas décadas, debido precisamente al incremento de la importancia económica de esta actividad y a la evolución de los niveles organizativos del sector extractivo, los procesos relacionados con las técnicas de acuicultura marcan una influencia muy destacada a la hora de optimizar la producción de estos moluscos bivalvos.

El desarrollo del cultivo de la almeja fina en Galicia ha estado ligado principalmente a la abundancia de reclutamientos de semilla en el medio natural, dando origen a extensos y productivos bancos naturales, que son la base de la producción marisquera. La sobreexplotación a la que han sido sometidos los bancos naturales, la entrada de otras especies de bivalvos alóctonas que compiten por el hábitat, así como distintas patologías como la infección por el parásito *Perkinsus* sp., dieron lugar a la práctica desaparición de algunos de ellos, lo que supuso una reducción en las capturas y que los sectores socioeconómicos asociados a la pesquería se hayan visto muy afectados.

Por tal motivo, se han intentado diversos métodos para recuperar la producción de los bancos como son: la regularización de las actividades marisqueras mediante la aplicación de tallas mínimas y épocas de veda y más recientemente mediante la elaboración de Planes de Explotación que regulan la extracción de zonas determinadas. Estos Planes se acompañan, cada vez con más frecuencia, con campañas de repoblación con el objetivo de potenciar el reclutamiento natural de la especie.

Así, a partir de 1996, la venericultura gallega experimentó un cambio al potenciar el cultivo semi-extensivo de la almeja fina por parte del Gobierno Autónomo Gallego pero, para poder aumentar la producción, es importante poder contar con aporte de semilla cultivada en criaderos, suficiente como para garantizar una buena explotación del recurso. El coste de producción de la semilla es elevado, debido principalmente al mantenimiento de las instalaciones de un criadero y, sobre todo, a la necesidad de cultivar en paralelo microalgas para alimentar a los moluscos en todas sus fases (adultos, larvas y semilla). Esta producción de microalgas representa uno de los principales costes de explotación de los criaderos industriales de bivalvos (Persoone y

Claus, 1980), lo que conlleva que el precio de venta de la semilla sea alto, sobre todo para esta especie, debido a los problemas intrínsecos que plantea su cultivo si se compara con otras especies como la almeja babosa o japonesa. La progresiva profesionalización del sector marisquero y conchicultor ha puesto en evidencia la necesidad de disponer de más criaderos que produzcan y oferten más semilla de calidad, de forma estable y continuada.

A pesar de todo el esfuerzo, tanto técnico como económico, que se ha destinado a optimizar la producción de semilla de almeja fina en los criaderos, las cifras de producción siguen siendo muy reducidas. Y es, fundamentalmente, porque esta producción no está garantizada debido sobre todo, a episodios de mortalidades masivas que acaban con toda la producción en pocos días. Posiblemente, gran parte de las causas que condicionan esta falta de desarrollo, se encuentran en la escasez de conocimientos de los procesos básicos del cultivo de esta especie, y en una inadecuada gestión de transferencia tecnológica al sector cultivador.





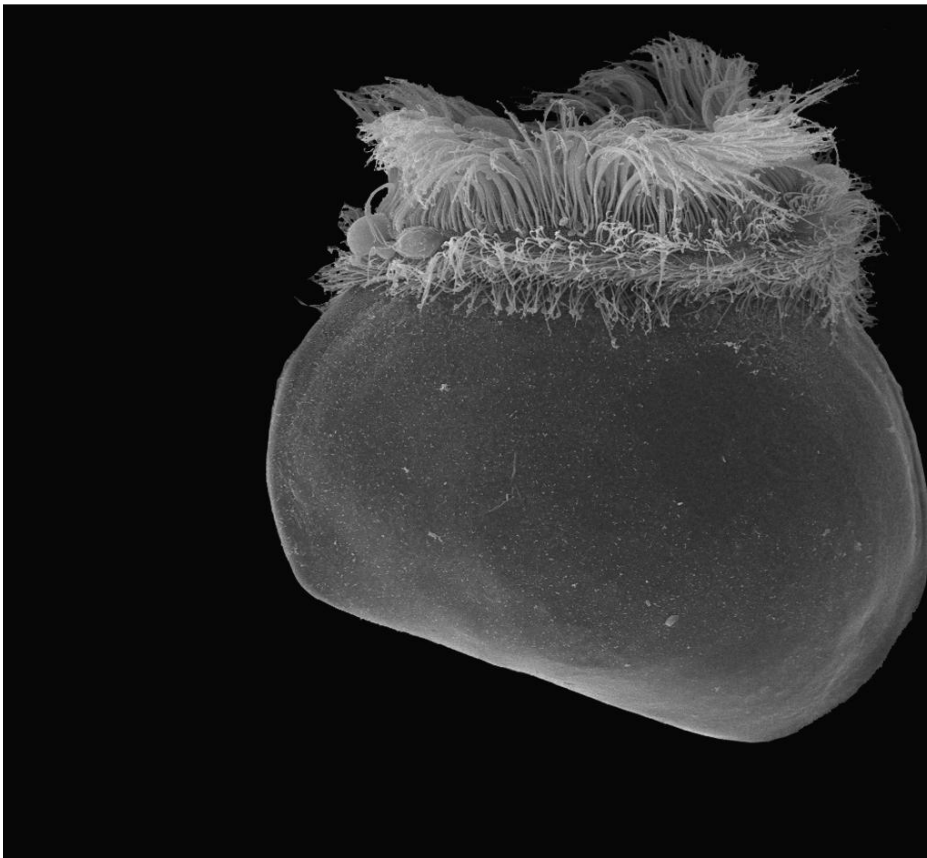
OBJETIVOS

El Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo lleva desde la década de los 90 estudiando los aspectos claves que bloquean la producción de semilla de almeja fina, *Ruditapes decussatus*, en criadero. Estos trabajos han servido para sentar las bases del cultivo intensivo de *R. decussatus* en un criadero, y son el preámbulo de esta memoria, en la que el objetivo principal es la optimización de este cultivo mediante la consecución de los siguientes objetivos parciales:

1. Describir el desarrollo embrionario y larvario de *R. decussatus* con microscopía óptica y electrónica de barrido y de transmisión, con especial interés en el proceso de diferenciación de la concha, como estudio básico para comprender mejor la biología de esta especie, y así optimizar su cultivo larvario.
2. Ensayar diferentes dietas microalgales y determinar su efecto en el crecimiento y supervivencia larvaria. Además, estudiar la composición bioquímica y de ácidos grasos de estas dietas, así como de las larvas alimentadas con las mismas, y de esta manera poder definir una dieta que se ajuste mejor a las necesidades nutricionales que tiene esta especie durante su cultivo larvario.
3. Evaluar el efecto, sobre la carga bacteriana de los reproductores, de diferentes protocolos de acondicionamiento, variando la temperatura y el alimento suministrado. Por otro lado, evaluar el efecto de una depuración, previa a la obtención de los gametos, sobre la viabilidad de su posterior cultivo larvario así como la potencial transmisión vertical bacteriana. Ambos objetivos, con el fin de desarrollar un protocolo microbiológico “eco-friendly” que favorezca la reducción de la carga bacteriana asociada a los reproductores durante su acondicionamiento, particularmente las especies del género *Vibrio*.



Embriología y desarrollo larvario

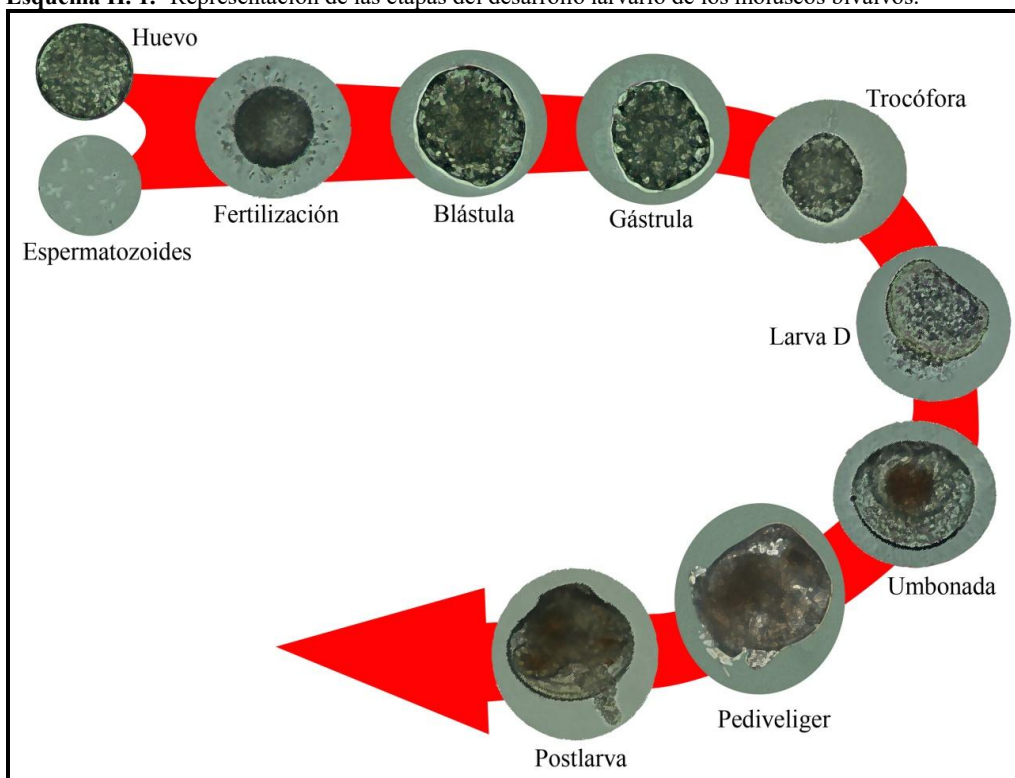




INTRODUCCIÓN

El desarrollo larvario de numerosas especies de Eulamellibranchia se ha descrito proporcionando conocimientos básicos para la acuicultura y para la identificación de estadios larvarios en el plancton (Loosanoff y Davis, 1963; Loosanoff, *et al.*, 1966). En el esquema II. 1 se representa, de forma general, las distintas fases del desarrollo larvario de un molusco bivalvo.

Esquema II. 1.- Representación de las etapas del desarrollo larvario de los moluscos bivalvos.



En las primeras 24 h tiene lugar el desarrollo embrionario, en el cual el huevo fecundado pasa por las fases multicelulares de blástula y gástrula y se convierte en una trocófora con motilidad. La fase inicial del desarrollo larvario es conocida como la fase de la charnela recta o larva D. Ésta presenta dos valvas, un sistema digestivo completo y un velo. Conforme crecen, en la zona de la charnela, las larvas desarrollan una protuberancia llamada umbo, dando nombre a la fase de larva umbonada. Pasados unos días, y conservando el velo, la larva desarrolla un pie con el que reptar por el sustrato; será la larva pediveliger. La fijación y metamorfosis se produce cuando la larva, de vida planctónica, pasa a un modo de vida sésil o bentónica, con apariencia de adulto, dando

lugar a la fase de postlarva o juvenil. Es en este momento cuando el velo se pierde o reabsorbe y se comienzan a desarrollar los filamentos branquiales, así como los demás órganos propios de un individuo adulto. La duración de la fase larvaria varía, dependiendo de la especie y de determinados factores como la temperatura y la disponibilidad de alimento.

En el trabajo rutinario de un criadero, las distintas fases larvarias se estudian al microscopio óptico, pero con esta observación hay detalles de la estructura y organización microscópica de interés que pasan desapercibidos. Es por ello, que el desarrollo embrionario y larvario no puede seguirse en detalle mediante microscopía óptica, y algunos autores ya han afrontado el estudio de diferentes aspectos de larvas y postlarvas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET). Estos microscopios producen imágenes de alta resolución, lo que significa que características espacialmente cercanas en la muestra pueden ser examinadas a una alta magnificación, aunque el microscopio electrónico de barrido posee menor capacidad de aumento que el microscopio electrónico de transmisión. La MEB nos permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos proporcionándonos información morfológica tridimensional de la muestra analizada, mientras que con MET, se puede acometer el estudio de las células a nivel molecular.

Diversos aspectos de estos desarrollos, tanto embrionarios como larvarios, se han estudiado ya en muchas especies mediante microscopía óptica y electrónica de barrido. Existen trabajos que describen el desarrollo completo de las especies estudiadas (Redfearn, 1982; Redfearn, *et al.*, 1986; Redfearn, 1987; Hodgson y Burke, 1988; Bellolio, *et al.*, 1993; Mouëza, *et al.*, 1999; da Costa, *et al.*, 2008; Cerviño-Otero, *et al.*, 2009; da Costa, 2009; Wassnig y Southgate, 2012), otros que se centran en los primeros estadios embrionarios hasta la larva D (Gros, *et al.*, 1999; Silberfeld y Gros, 2006; Raleigh y Keegan, 2007) y algunos, que sólo estudian detalles concretos (Martel, *et al.*, 1995; Dufour y Beninger, 2001; Cannuel, *et al.*, 2009; Allen, 2011), sin embargo, son escasos los estudios mediante microscopía electrónica de transmisión (Eyster y Morse, 1984; Eyster, 1986; Cragg, 1989; Tardy y Dongard, 1993; Gros, *et al.*, 1997; Casse, *et al.*, 1998; Mouëza, *et al.*, 2006; Cerviño-Otero, 2011; da Costa, *et al.*, 2011).

A pesar de la existencia de numerosos estudios sobre diversos aspectos de la morfología larvaria, el proceso de diferenciación de la glándula de la concha y la estructura de la concha larvaria, están entre los menos conocidos (Waller, 1981). En los moluscos, la formación de la misma se inicia durante la embriogénesis. En los bivalvos, la concha larvaria recibe el nombre de prodisoconcha y se compone de dos regiones diferenciadas: prodisoconcha I (PI) y prodisoconcha II (PII) (Ockelmann, 1965). De forma general, está aceptado que la secreción del primer material de la concha por las células epiteliales de la glándula de la concha, va precedida por la invaginación de la región dorsal del ectodermo de la glándula de la concha (Eyster y Morse, 1984). Durante la gastrulación, se observan dos depresiones independientes, la más pequeña, el blastoporo y la mayor, que dará lugar a la glándula de la concha.

Las primeras observaciones sobre el proceso de diferenciación de la glándula de la concha durante el desarrollo embrionario, fueron descritas en gasterópodos por Gengenbaur y en bivalvos por Stepanoff (en Kniprath, 1980). Este autor investigó la formación temprana de la glándula de la concha en *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) con microscopía electrónica de transmisión y sugirió que la invaginación necesita cerrarse antes de formar la concha. Pocos años después, Eyster y Morse (1984) en *Spisula solidissima* (Dillwyn, 1817) y Casse *et al.* (1998) en *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758), confirmaron esta teoría. Sin embargo, Mouëza *et al.* (2006), estudiando *Chione cancellata* (Linnaeus, 1758), propusieron una interpretación alternativa para la diferenciación de la concha en bivalvos, en la cual postularon que la glándula de la concha no migra hacia el interior y nunca constituye una invaginación por sí misma, y que la prototroca (corona de cilios) junto con la glándula de la concha, constituyen una hendidura abierta al final de la cual están en estrecho contacto; además, describieron los distintos tipos de células que participan en la secreción de la concha, hablando de células T1 o células secretoras del periostraco y células T3, o células no secretoras del periostraco, pero que sí participan en la producción de la capa orgánica segunda de la concha y que están ligadas con la calcificación de la misma. A lo largo de este capítulo, se empleará esta terminología para referirnos a tales células.

En la clase Bivalvia ocurren diversos tipos de desarrollo larvario (Chanley, 1968). En los bivalvos marinos, el patrón de desarrollo más común consiste en la liberación de los gametos al agua y, consecuentemente, la fertilización y el desarrollo

embrionario ocurren externamente (Ockelmann, 1965). La larva resultante es una larva trocófora ciliada y, por lo tanto, móvil, que al secretarse la prodisoconcha I se convertirá en una larva D-veliger planctónica. La secreción continúa en el borde de la prodisoconcha de la larva D dando lugar a la prodisoconcha II. En el momento en el que la larva es capaz de reptar (gracias a la aparición del pie), así como de nadar (facultad que se la proporciona el velo), se alcanza el estadio de pediveliger, el cual está próximo a la metamorfosis (Cragg y Crisp, 1991).

Este es el primer estudio sobre la embriología y el desarrollo larvario de la almeja fina, *Ruditapes decussatus*, con especial atención al proceso de diferenciación de la concha, mediante microscopía electrónica de barrido y transmisión. Los principales objetivos de este capítulo son: 1, confirmar si el modelo de diferenciación de la concha propuesto por Mouëza *et al.* (2006) para *C. cancellata* es sólo válido para esta especie o, si por el contrario, puede generalizarse en otros venéridos; y 2, proporcionar, mediante microscopía electrónica de barrido, una descripción detallada de la morfología externa, tanto embrionaria como larvaria, de *R. decussatus*, siendo la principal justificación, el conocimiento en profundidad de la biología de esta especie, con el fin de mejorar su cultivo en criadero, y así obtener semilla para potenciar la producción de esta especie de interés marisquero y abastecer al sector con la misma.

MATERIAL Y MÉTODOS

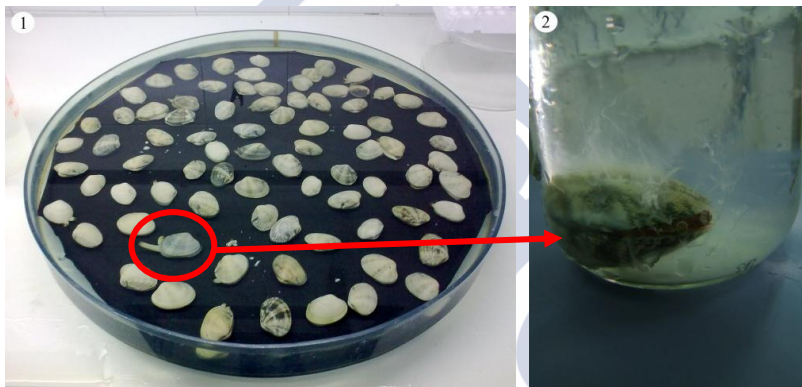
Inducción a la puesta y fertilización

Para la obtención de los gametos con los que se abordó el estudio del desarrollo embrionario y larvario de la almeja fina, *Ruditapes decussatus*, se utilizaron individuos de talla superior a la mínima exigida para su comercialización, procedentes de un banco natural de la zona intermareal de la localidad de Cambados, en la Ría de Arousa (Galicia, NO de España). Se trasladaron en condiciones de frío (4°C), a nuestras instalaciones en el Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo. Una vez allí, se acondicionaron durante dos meses y medio en tanques de 200 L de capacidad, con circuito abierto de agua filtrada por filtro de arena, a una temperatura que se incrementó paulatinamente, desde la temperatura ambiente ($\approx 16^{\circ}\text{C}$) hasta los $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ y con una alimentación constituida por una mezcla de *Isochrysis galbana* (Parke, 1949), *I. galbana* T-iso, *Diacronema lutheri* (Bendif & Véron, 2011), *Tetraselmis suecica* (Butcher, 1959), *Chaetoceros* sp. y *Skeletonema marinoi* (Sarno & Zingone, 2005). Su maduración gonadal fue seguida por histología clásica y el desove se obtuvo dos meses antes de la época de puesta natural.

Para la inducción a la puesta se prepararon 79 individuos, limpiando su superficie con agua dulce, y se mantuvieron en seco a 4°C (en nevera) durante 12 h. Tras este primer estímulo, se colocaron en una bandeja con fondo oscuro y con agua de mar esterilizada por UV (Fig. II. 1). La inducción se llevó a cabo mediante la técnica conocida como “choque térmico”. Las almejas se sometieron a cambios bruscos de temperatura: se mantuvieron durante dos horas a 25°C y posteriormente se pasaron a agua fría a 14°C durante 30 minutos. Este ciclo de agua caliente-agua fría fue necesario repetirlo dos veces para que la inducción fuera efectiva. Además y con el fin de que el estímulo fuese mayor, también se añadieron microalgas y extracto de gónada de algún ejemplar macho.

Cuando los ejemplares inducidos comenzaron a expulsar gametos, se individualizaron en vasos (Fig. II. 2), de manera que se pudo recoger gametos de ambos sexos antes de que ocurriera la fertilización. Es posible identificar si lo que está desovando es un macho o una hembra, ya que el esperma es expulsado a través del sifón

exhalante en un chorro fino y constante, mientras que la liberación de los ovocitos, también por el sifón exhalante, es más intermitente y se emiten formando “nubes”. Los huevos se dispusieron en un vaso de precipitados de volumen conocido. Se homogeneizaron, se tomaron 5 alícuotas que se depositaron en portaobjetos excavados y se procedió al conteo de las mismas bajo la lupa. A partir de estas muestras, se calculó el número total de huevos obtenidos en el desove. Los espermatozoides recogidos de todos los machos que participaron en la puesta se mezclaron y se añadieron pequeñas cantidades de esta mezcla a un recipiente, con agua a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, en el que también se habían mezclado todos los huevos obtenidos, de forma que la fecundación fuera controlada y lo más sincrónica posible. Tras la fertilización, los huevos fueron tamizados a través de una malla de $45\ \mu\text{m}$ para eliminar el exceso de espermatozoides.



Figuras 11. 1-2.- 1. Reproductores en la bandeja de inducción. 2. Macho desovando una vez individualizado.

Cultivo larvario

La incubación y el cultivo larvario se realizaron en tanques troncocónicos de fibra de vidrio de 500 litros a una densidad inicial de $6,5\ \text{larvas mL}^{-1}$, con agua de mar filtrada (filtros de arena y cartucho de $1\ \mu\text{m}$) y esterilizada por UV, provistos de aireación y a una temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$. La salinidad varió entre 32-35‰. El cambio de agua se realizó cada dos días, aprovechando para limpiar los tanques.

La alimentación se hizo diariamente, con una mezcla de: *Isochrysis galbana*, *Diacronema lutheri*, *Skeletonema marinoi*, *Chaetoceros* sp. y *Tetraselmis suecica*. Las raciones suministradas variaron a lo largo del desarrollo, desde 40 células equivalentes μL^{-1} al inicio, hasta 60 células equivalentes μL^{-1} al final del cultivo.

Visionado en el microscopio óptico

Los huevos y los espermatozoides, así como los posteriores estadios embrionarios y larvarios, se midieron y fotografiaron en un analizador de imagen NIS-Elements BR 3.0 de Nikon, acoplado a un microscopio óptico Nikon Labophot-2 (Fig. II. 3). Para controlar los tiempos en los que aparecen las diferentes fases del desarrollo embrionario, se observaron las larvas “*in vivo*” cada 10 minutos al microscopio óptico. Desde la fase de trocófora hasta larva D, se tomaron muestras cada hora y a partir de este momento, el control se realizó diariamente. En cada estadio del desarrollo se tomaron, al menos 100 individuos elegidos aleatoriamente, que se midieron y fotografiaron de la misma manera que los gametos. Se consideró la aparición de un nuevo estadio cuando, como mínimo, el 50% de las larvas lo presentaban.



Figura II. 3.- Microscopio óptico Nikon Labophot-2 con un analizador de imagen NIS-Elements BR 3.0 de Nikon.

Toma de muestras y procesado para microscopía electrónica de barrido

Según se fue identificando la aparición de nuevos estadios mediante el visionado en el microscopio óptico, se cogieron muestras de éstos para microscopía electrónica de barrido (MEB). Éstas se procesaron como se indica en el esquema II. 2.

Esquema II. 2.- Protocolo de preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido.

Fijación

1. Depositar las muestras en tubos Eppendorf y lavarlas en tampón cacodilato 0,1 M.
 2. Fijar la muestra en glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M. durante 4 h a 4°C.
 3. Realizar varios lavados con el tampón cacodilato (3-12 h), también a 4°C.
 4. Postfijar en OsO₄ al 1% en el mismo tampón, durante 1 h a 4°C.
 5. Lavar de nuevo con tampón cacodilato. La muestra queda lista para la deshidratación.
- Se realiza todo el proceso en cabina de gases.

Deshidratación

Una vez fijados los tejidos, han de ser lavados con agua destilada para eliminar sales y otros electrolitos. A continuación, el agua de estos tejidos ha de ser eliminada.

6. Comenzar con etanol al 30% durante 15 min.
7. Llevar a cabo la siguiente escala de etanoles:
 - 50% - 2 x 15 ó 3 x 10 min.
 - 70% - 2 x 15 ó 3 x 10 min.
 - 80% - 2 x 15 ó 3 x 10 min.
 - 90% - 2 x 15 ó 3 x 10 min.
 - 100% - 3 x 15 min.

La muestra queda ya preparada para la sustitución.

Sustitución

Después de que la muestra haya sido deshidratada, hemos de sustituir el etanol por un líquido que sea miscible con el CO₂ líquido, de forma que se pueda llevar a cabo la desecación total en la cámara de Punto Crítico.

8. Llevar a cabo la siguiente escala Amiloacetato - Etanol:
 - 1:3 - 2 x 15 ó 3 x 10 min.
 - 2:2 - 2 x 15 ó 3 x 10 min.
 - 3:1 - 2 x 15 ó 3 x 10 min.
 - Amiloacetato 100% - 3 x 15 min.

Realizar todo el proceso en cabina de gases.

Desecación

Nos permite mantener la estructura intacta al sustituir los líquidos internos por gas, usando el Desecador de Punto Crítico.

Montaje en los portamuestras

Para que las muestras puedan ser observadas al microscopio, deben hacerse conductoras y estar montadas en el portamuestras ("stubs") adecuado para el microscopio.

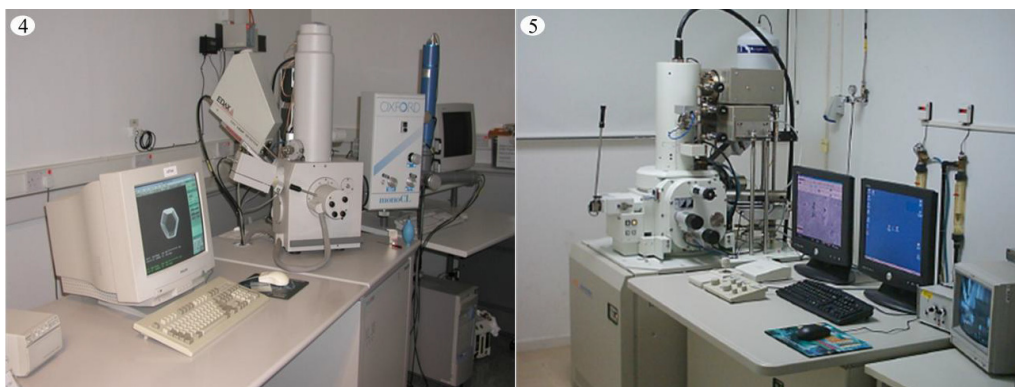
9. Usar discos de grafito para adherir la muestra, en la orientación adecuada, al stub de aluminio.

Recubrimiento con oro

Es el paso definitivo para poder llevar a cabo el estudio de nuestra muestra al microscopio.

Visionado de las muestras

Se han utilizado dos microscopios electrónicos de barrido, un Philips XL30 y un Jeol JSM 6700. (Figs. II. 4 y 5).



Figuras II. 4-5.- Microscopios electrónicos de barrido (MEB) pertenecientes al CACTI de la Universidad de Vigo. 4. Philips XL30. 5. Jeol JSM 6700.

Toma de muestras y procesado para microscopía electrónica de transmisión

Desde el estadio de gástrula hasta la aparición de la larva D, se tomaron muestras y se prefijaron siguiendo el mismo procedimiento que para MEB, el resto del protocolo de procesado difiere en algún aspecto (Esquema II. 3).

Esquema II. 3.- Protocolo de preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión (MET).

Fijación

Al igual que para el microscopio electrónico de barrido, la fijación de las muestras se realizó con glutaraldehído y la postfijación con tetróxido de osmio.

Deshidratación

Después de enjuagar la muestra, se deshidrató mediante la siguiente escala ascendente de acetonas:

- Acetona al 50% - 1 x 10 min.
- Acetato de uranilo 1% en acetona al 70% - 1 x 60 min.
- Acetona al 70% - 2 x 15 min.
- Acetona al 80% - 2 x 15 min.
- Acetona al 90% - 2 x 15 min.
- Acetona al 95% - 2 x 15 min.
- Acetona al 100% - 2 x 15 min.

Impregnación en resina

Después de que las muestras fueron deshidratadas, se impregnaron en resina “Spurr”, en nevera a 4°C y rotor:

- 1 Spurr: 3 acetona - 1 x 2 h.
- 2 Spurr: 1 acetona - 1 x 2 h.
- 3 Spurr: 1 acetona - 1 x 3-4 h.

Posteriormente se incluyeron en resina total a temperatura ambiente:

- Resina total - 1 x 2-5 h.
- Resina total - 1 x 12 h.
- Resina total - 1 x 2 h.

Finalmente, se incluyeron en resina “Spurr”, a 60°C durante 48 h.

Piramidado y corte de las muestras

1. Para el piramidado de los bloques se empleó un piramidotomo Leica Ultratim.
2. Se realizaron cortes semifinos que se tiñeron de azul de metileno y se observaron al microscopio óptico, para seleccionar las zonas de interés de la muestra.
3. Se repiramidó sobre la zona seleccionada.
4. Se realizaron los cortes ultrafinos (70-90 nm) con el ultramicrotomo Leica Reichert Ultracut.

Contrastado de las muestras

Hay que contrastar las muestras con una sustancia que resulte opaca a los electrones, para ello se sometieron a tinción negativa, impregnando los ultrafinos con disoluciones de metales pesados de alto número atómico:

1. Disolución acuosa de acetato de uranilo 2% - 1 x 30 min.
2. Disolución de citrato de plomo - 1 x 10 min.

Visionado de las muestras

Se emplearon dos tipos diferentes de microscopios electrónicos de transmisión, según el tipo de fotografía a realizar. Para las microfotografías de embriones o larvas enteras, se utilizó un Dual Beam Focused Ion Beam (FIB) FEI Helios 600 Nanolab, y para las microfotografías de zonas más detalladas, se empleó un Jeol Jem 1010.



RESULTADOS

De los 79 reproductores sometidos a la inducción desovaron 40, de los cuales 18 eran hembras y 22 machos. Hicieron falta 3 ciclos de agua “caliente-fría” hasta que los primeros individuos empezaron a expulsar gametos. Aproximadamente, se obtuvieron 1,8 millones de huevos por hembra.

El ovocito es esférico, con un diámetro de $67,43 \pm 3,62 \mu\text{m}$ (Figs. II. 6 y 14). Presenta una delgada ($1-2 \mu\text{m}$) cubierta refringente a la luz del microscopio óptico, después de que la fecundación tuviese lugar. Los espermatozoides, después de ser expulsados, permanecieron activos durante las dos primeras horas, siendo todavía aptos para la fertilización en ese momento. Se caracterizan por poseer una cabeza con forma de trompeta, ligeramente curvada, que mide aproximadamente $8 \mu\text{m}$ desde la punta del acrosoma hasta el final de la parte media. En la base de esta zona, se localizan las mitocondrias, que en el caso de esta especie parece que son cuatro. (Fig. II. 15). La longitud de los espermatozoides, medida desde el ápice de la cabeza hasta la parte final de la cola, ronda las $40 \mu\text{m}$ (Fig. II. 16). En este estudio la fertilización ocurrió con normalidad.

En la Tabla II. I, se muestran los tiempos de aparición de los distintos estadios embrionarios y larvarios de *Ruditapes decussatus*. A los 20 minutos tras la fecundación ($T_0+20 \text{ min}$), se produce la extrusión del primer corpúsculo polar (Figs. II. 7 y 16). Éste mide entre 6 y $8 \mu\text{m}$. La primera división es meridional y desigual, resultando en el polo vegetal del huevo, un gran lóbulo polar ($55 \mu\text{m}$) anucleado, unido a dos blastómeros nucleados de igual tamaño ($35 \mu\text{m}$). Este estadio, llamado trébol (Figs. II. 8 y 17), precede a la fusión del lóbulo polar (anucleado) con uno de los blastómeros (con núcleo), formándose un estadio de dos células con dos blastómeros (AB y CD) desiguales y nucleados (Figs. II. 9 y 18). Este estadio de dos células se alcanza pasadas 1 h y 15 min desde la fertilización, presentando un corpúsculo polar en el plano de división.

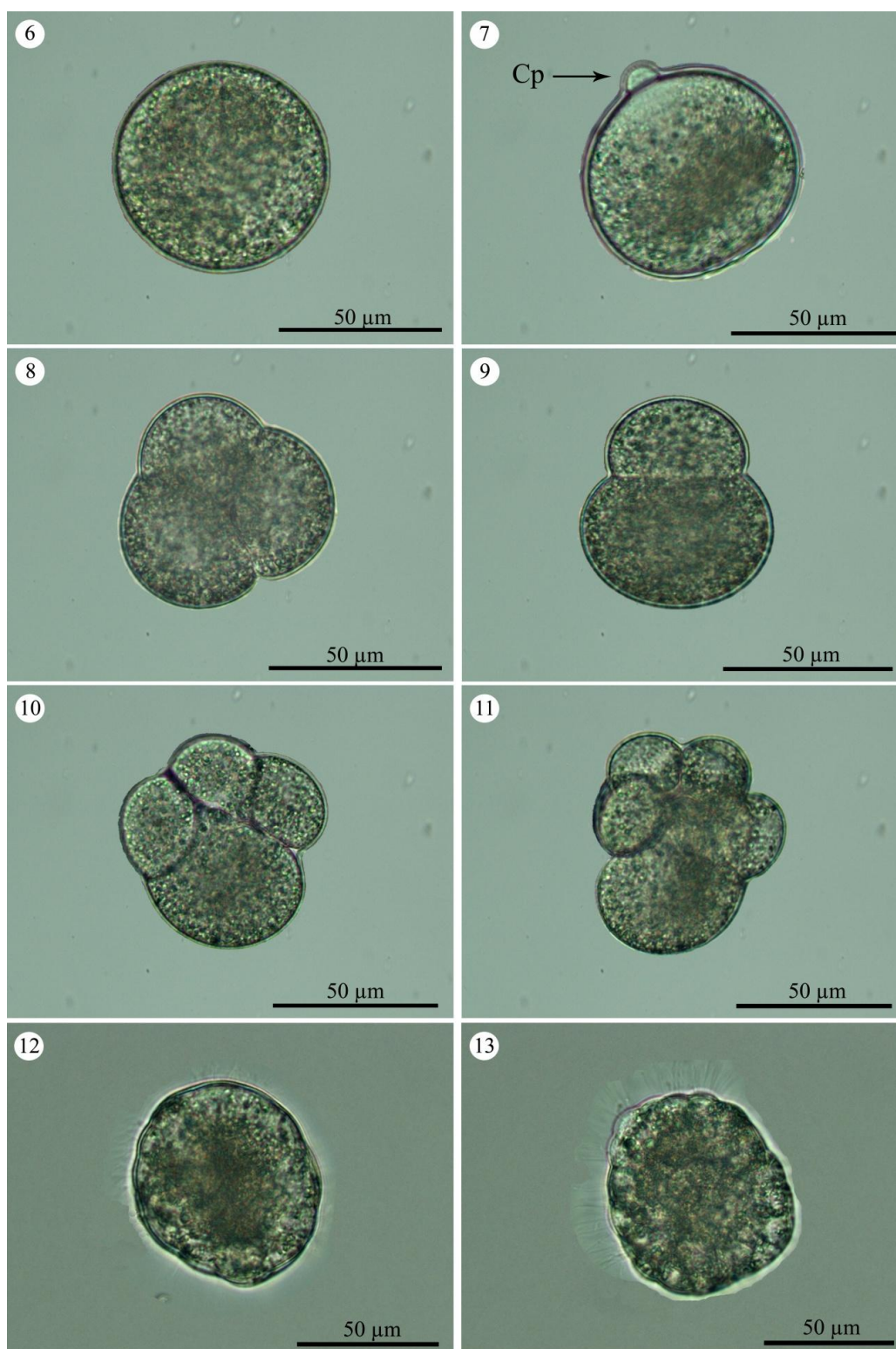
Tabla II. I.- Tiempos de aparición de los estadios embrionarios y larvarios de *Ruditapes decussatus*.

Estadio	Tiempo post-fertilización
Huevo	0
2 células	1 h 15'
4 células	1 h 45'
8 células	2 h 15'
16 células	4 h
32 células	4 h 45'
Blástula	6 h
Gástrula	8 h
Trocófora	13 h
Larva D	26 h
Umbonada	7 días
Pediveliger	15 días
Metamorfosis y fijación	27 días

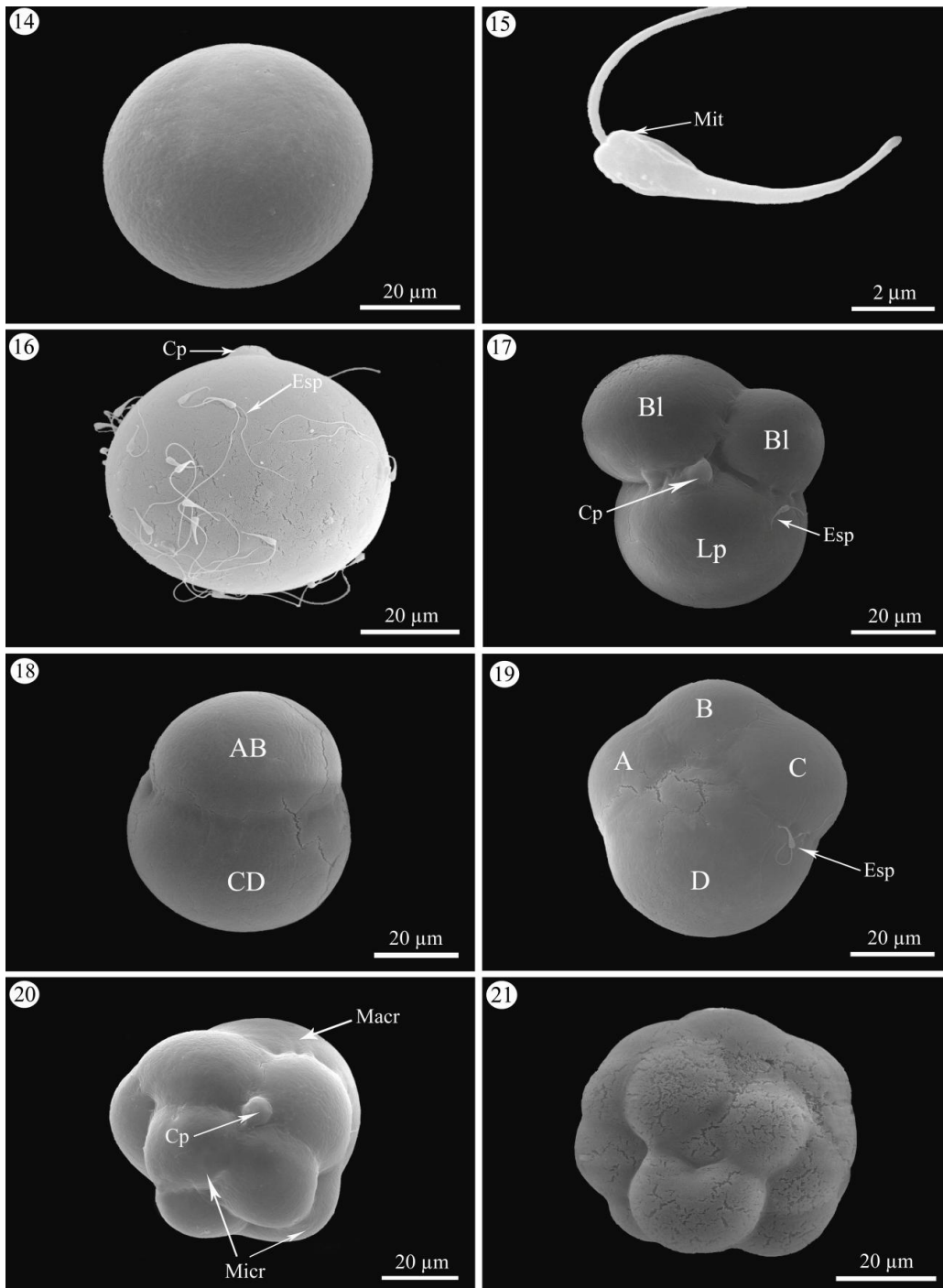
Transcurridas 1 h y 45 min post-fertilización se observa el estadio de 4 células (Figs. II. 10 y 19) con tres blastómeros iguales (A, B y C) y otro de mayor tamaño en el polo vegetal (D). A las 2 h y 15 min pf se alcanza el estadio de 8 células con 7 micrómeros dispuestos en el polo animal sobre un macrómero localizado en el polo vegetal (Figs. II. 11 y 20). En esta fase aún es visible un corpúsculo polar. Como se observa en la figura II. 21, el estadio de 16 células es visible a las 4 hpf y el estadio de 32 células aparece a las 4 h y 45 min pf (Fig. II. 22).

A la par que se suceden las divisiones, los micrómeros resultantes engloban al macrómero hasta quedar totalmente envuelto, produciendo el siguiente estadio llamado blástula (Figs. II. 12 y 23) a las 5 h y 30 min pf. Éste, es el primer estadio móvil del desarrollo, gracias a la aparición de los primeros cilios de unos 6-8 μm (Fig. II. 24).

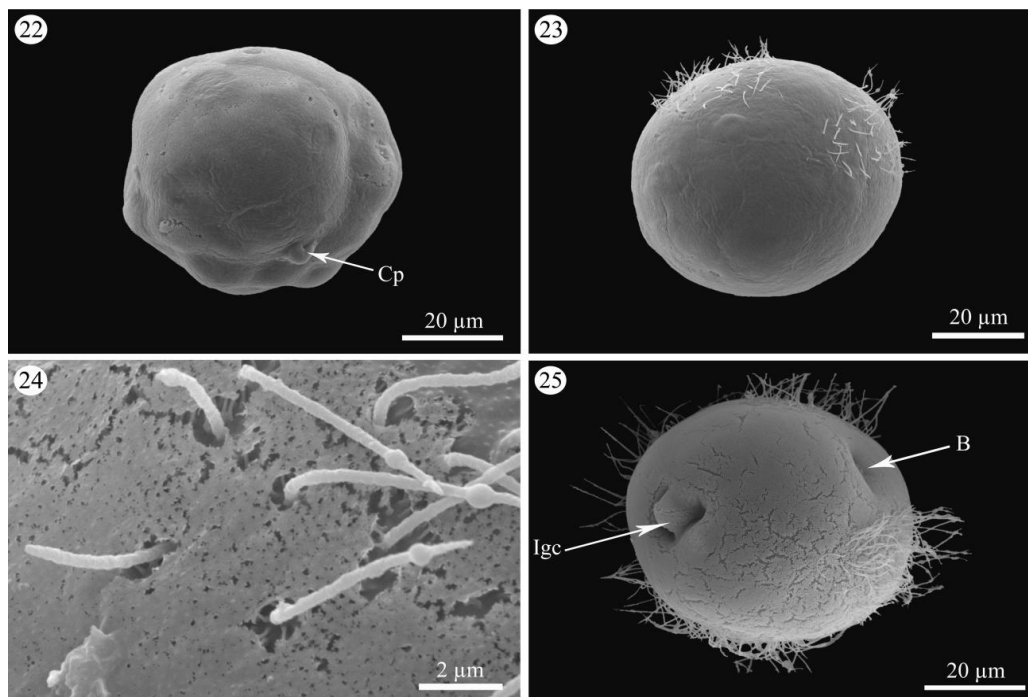
La gastrulación ocurre por epibolia apareciendo la gástrula a las 7 h y 15 min pf, presentando cilios de 12-15 μm (Figs. II. 13, 25, 26 y 27). En este estadio aparece el blastoporo, como resultado de una invaginación, que inicialmente se observa en el polo vegetal y que según transcurre la gastrulación, se desplaza hacia la parte ventral de la futura larva (Figs. II. 25 y 26). También aparece otra invaginación, opuesta al blastoporo, correspondiente a la glándula de la concha (Figs. II. 25, 27-31).



Figuras II. 6-13.- Fotografías al microscopio óptico del desarrollo embrionario de *R. decussatus*. **6.** Ovocito sin fecundar. **7.** Huevo fecundado extruyendo el corpúsculo polar (Cp). **8.** Estadio trébol. **9.** Estadio de 2 células. **10.** Estadio de 4 células. **11.** Estadio de 8 células. **12.** Blástula. **13.** Gástrula.

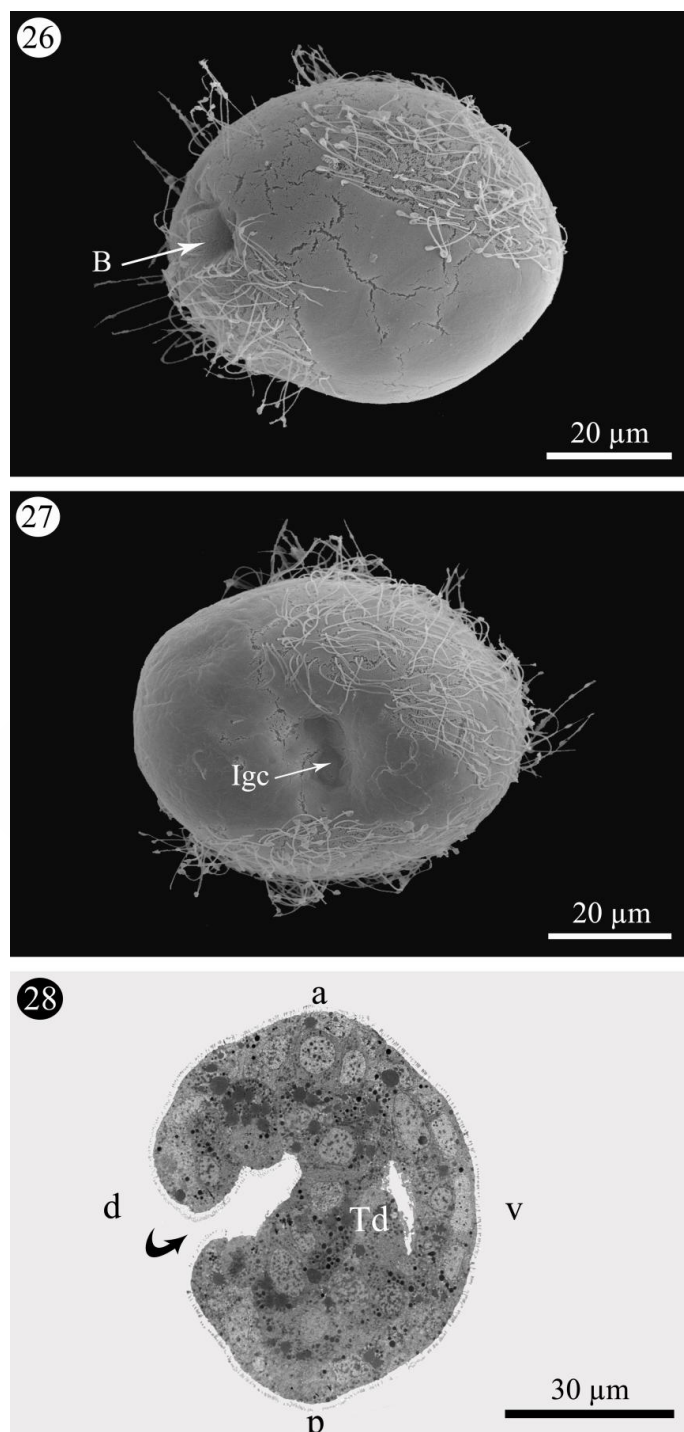


Figuras II. 14-21.- Microfotografías al microscopio electrónico de barrido del desarrollo embrionario de *R. decussatus*. **14.** Ovocito sin fecundar. **15.** Cabeza de un espermatozoide mostrando las mitocondrias (Mit). **16.** Huevo fecundado comenzando a extruir el corpúsculo polar (Cp) y con espermatozoides (Esp) en la superficie. **17.** Estadio de trébol, vista lateral, con el lóbulo polar (Lp) y los 2 blastómeros (Bl) formados. En el plano de división todavía se observa el corpúsculo polar (Cp). **18.** Estadio de 2 células (AB y CD), vista lateral. **19.** Estadio de 4 células (A, B, C y D). **20.** Estadio de 8 células, mostrando el macrómero (Macr) y los micrómeros (Micr), vista apical. Aún es visible el corpúsculo polar (Cp). **21.** Estadio de 16 células, vista apical.

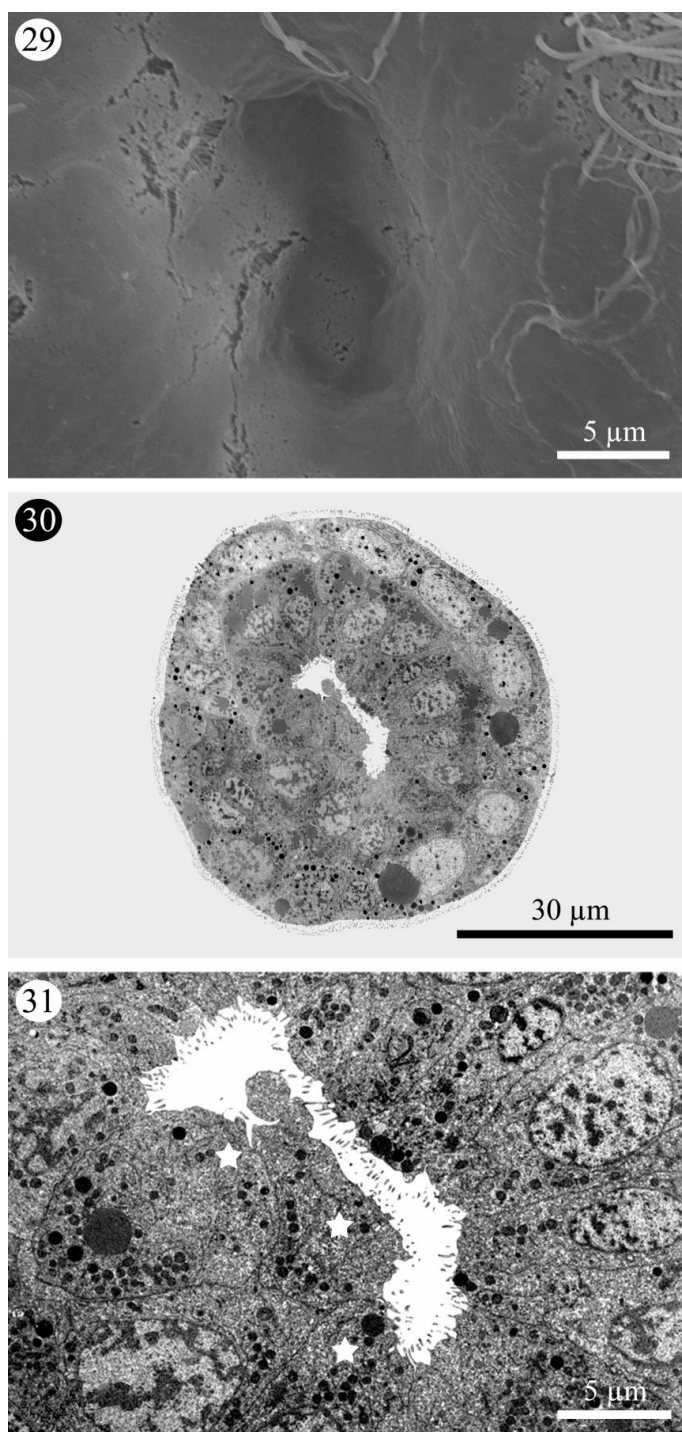


Figuras II. 22-25.- Microfotografías al microscopio electrónico de barrido del desarrollo embrionario de *R. decussatus*. **22.** Estadio de 32 a 64 células, con un corpúsculo polar (Cp). **23.** Blástula. **24.** Detalle de la aparición de los primeros cilios en el estadio de blástula. **25.** Gástrula mostrando el blastoporo (B) y la invaginación de la glándula de la concha (Igc).

En las imágenes de MET (Figs. II. 28, 30 y 31), en la región dorsal del estadio de gástrula aparece una hendidura abierta, la cual se expande por debajo de las células que formarán la prototroca. En una vista transversal, a través de esta cavidad (Figs. II. 30 y 31), se observa cómo las células basales, que forman la glándula de la concha, van perdiendo de forma progresiva las microvellosidades de su superficie. Estas células serán las encargadas de secretar el periostraco.



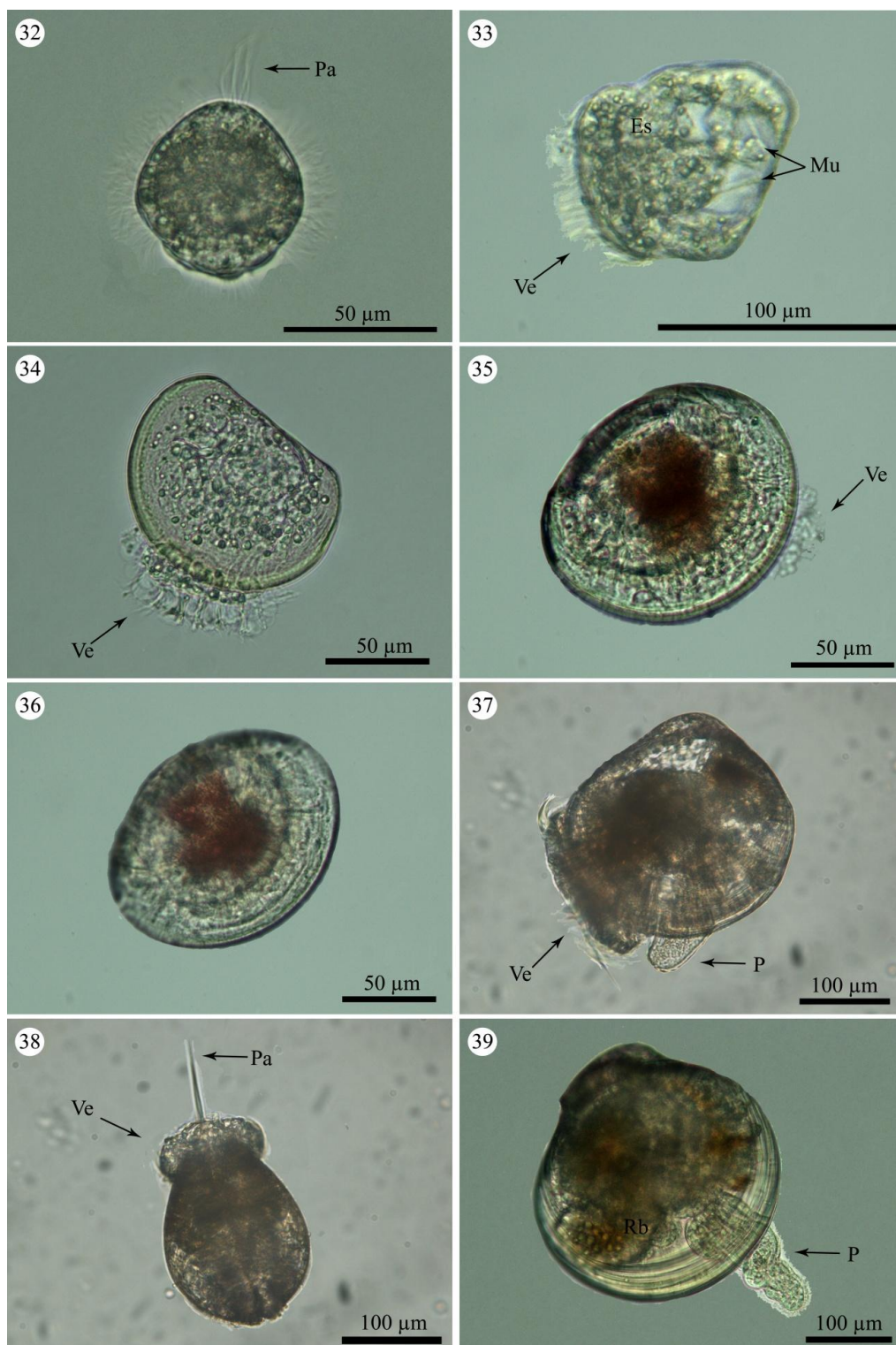
Figuras II. 26-28.- Microfotografías al microscopio electrónico de barrido (26 y 27) y al microscopio electrónico de transmisión (28) del desarrollo embrionario de *R. decussatus*. **26.** Gástrula mostrando el blastoporo (B). **27.** Gástrula mostrando la invaginación de la glándula de la concha (Igc). **28.** Sección sagital de una gástrula ciliada. En su interior observamos el tracto digestivo (Td). La flecha curvada señala la posición dorsal de la glándula de la concha. d-v: eje dorso-ventral. a-p: eje antero-posterior.



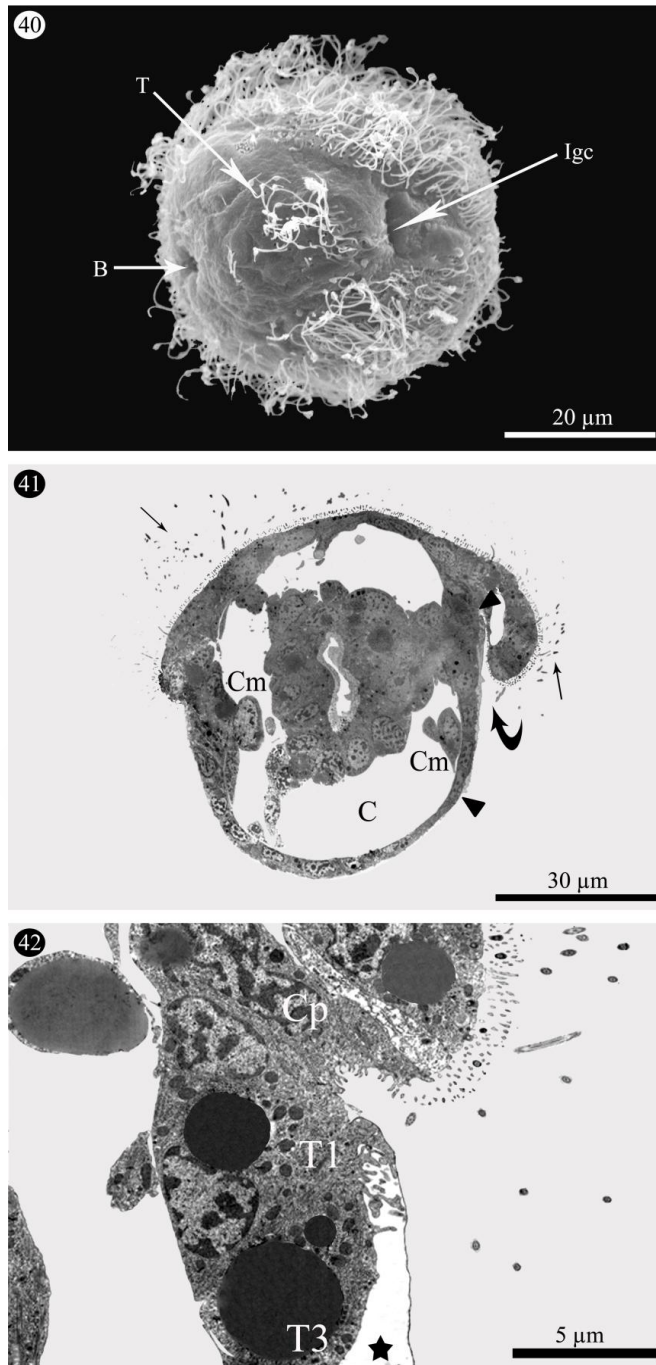
Figuras II. 29-31.- Microfotografías al microscopio electrónico de barrido (29) y al microscopio electrónico de transmisión (30 y 31) del desarrollo embrionario de *R. decussatus*. **29.** Detalle de la invaginación de la glándula de la concha. **30.** Sección transversal de una gástrula tardía en la zona de la invaginación de la glándula de la concha. **31.** Detalle de la figura 30 mostrando las células de la glándula de la concha (estrellas).

A las 12 h y 45 min pf la gástrula se diferencia en una típica larva trocófora piriforme (Figs. II. 32 y 40-45), de unos 50 μm de eje apico-basal, que nada de manera más activa que los dos estadios anteriores. La trocófora posee una corona de cilios llamada prototroca que la divide en dos regiones desiguales. En la parte ventral se dispone el blastoporo que dará lugar a la boca, mientras que en la parte dorsal se encuentra la glándula de la concha. En este momento, la diferencia de diámetros entre el blastoporo y la cavidad de la glándula de la concha es obvia. En la región posterior, un conjunto de cilios junto al ano forman la llamada telotroca, y en la región anterior, aparece otra corona de cilios; la metatroca, la cual está formada por un mechón de cilios más largos conocido como penacho apical (Figs. II. 32, 43 y 45). Posiblemente este penacho funcione como un órgano sensorial.

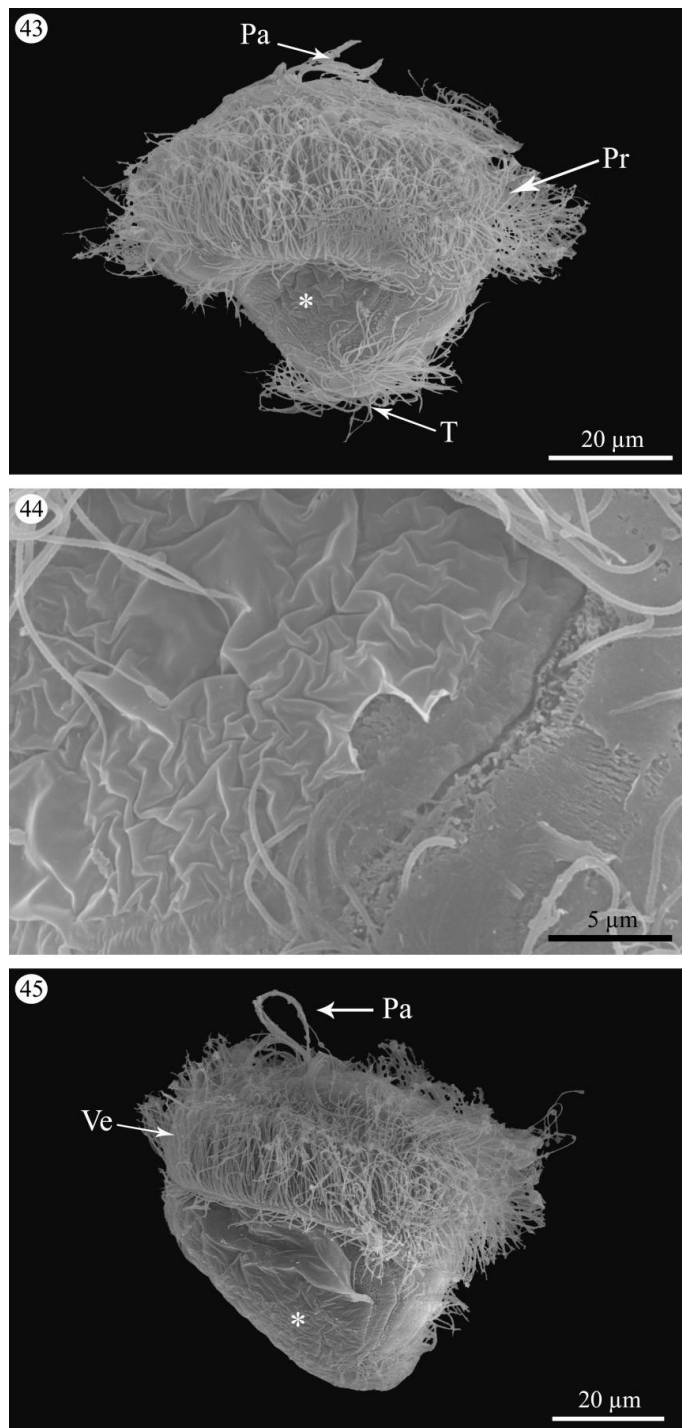
En la glándula de la concha comienza la secreción de la prodisoconcha I (PI); una delgada capa de aspecto membranoso y no calcificada totalmente (Fig. II. 44). Esta secreción se va depositando en dos lóbulos opuestos (Figs. II. 43, 45 y 48), quedando las dos regiones unidas por una banda más llamativa; la primera charnela, la cual presenta un aspecto estriado, que posiblemente se corresponderá con los futuros dientes de ésta (Figs. II. 48 y 49). El periostraco, el cual aparece como una densa película en las fotografías de MET (Figs. II. 41, 42, 46 y 47), cubre el polo apical de las células adyacentes a las que conforman la glándula de la concha. Inicialmente, emerge de las células secretoras T1, y avanza cubriendo a las células no secretoras de periostraco T3. Las células T1 mantienen, aunque cubiertas, unas pocas microvellosidades, mientras que las células T3 están totalmente desprovistas de ellas (Figs. II. 42 y 47). Las células T3 no secretan el material del periostraco, pero sí que participan en la formación de capas secundarias de la concha, y están involucradas en los procesos de calcificación de la misma. De esta manera, la secreción de las dos valvas continúa y acaba por comprimir lateralmente a la trocófora y el periostraco se inserta en el borde del manto (Figs. II. 46 y 47).



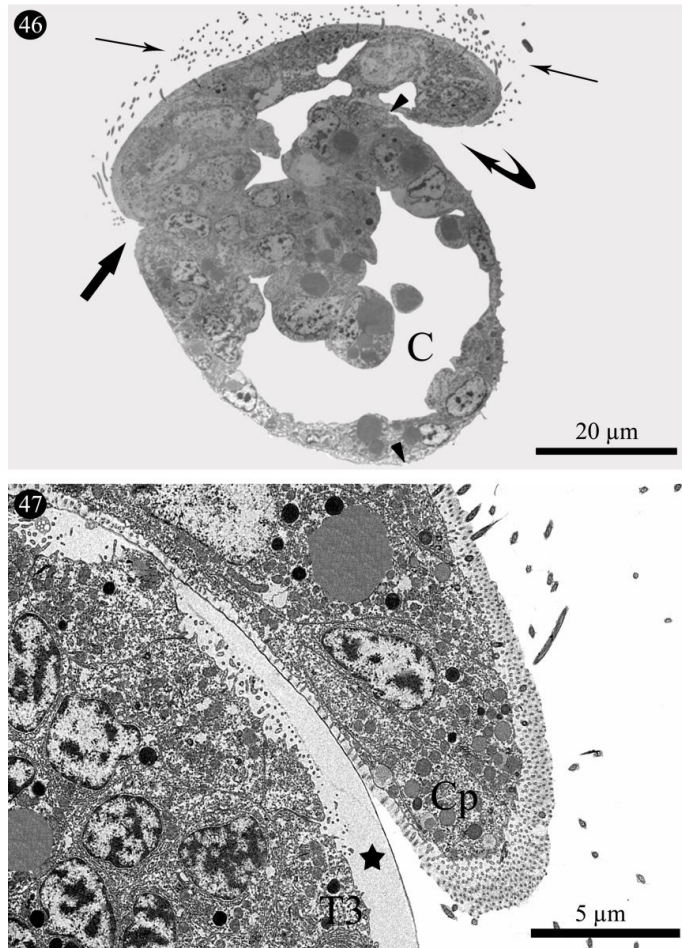
Figuras II. 32-39.- Fotografías al microscopio óptico del desarrollo larvario de *R. decussatus*. **32.** Trocófora con penacho apical (Pa). **33.** Larva D veliger temprana de 22 hpf; velo (Ve); estómago (Es); músculos retractores del velo (Mu). **34.** Larva D veliger de 30 hpf. **35.** Transición de larva D veliger a umbonada (5 hpf), mostrando el velo (Ve). **36.** Larva umbonada. **37.** Larva pediveliger de 15 dpf con pie (P) y velo (Ve). **38.** Larva pediveliger nadando; velo (Ve); penacho apical (Pa). **39.** Postlarva de 29 dpf con pie (P) y rudimentos branquiales (Rb).



Figuras II. 40-42.- Microfotografías al microscopio electrónico de barrido (40) y al microscopio electrónico de transmisión (41 y 42) del desarrollo embrionario de *R. decussatus*. **40.** Vista basal de la trocófora, mostrando la telotroca (T), el blastoporo (B) y la invaginación de la glándula de la concha (Igc). **41.** Sección transversal de una trocófora a las 12 hpf. El periostraco, depositado como una fina línea, aparece delimitado por triángulos y unido a la glándula de la concha (flecha curvada). Las flechas señalan los cilios de la prototroca. En el celoma (C) se observan las células musculares (Cm). **42.** Detalle del origen del periostraco, en el borde del manto, depositado por las células secretoras T1. Éstas, en contacto con la zona interna de las células de la prototroca (Cp), están caracterizadas por la escasez de microvellosidades que están cubiertas por una densa película de periostraco (estrella). Las células T3 están cubiertas por periostraco y desprovistas de microvellosidades.



Figuras II. 43-45.- Microfotografías al microscopio electrónico de barrido (43 y 45) y al microscopio electrónico de transmisión (44) del desarrollo embrionario de *R. decussatus*. **43.** Trocófora, mostrando la glándula de la concha (*), el penacho apical (Pa), la prototroca (Pr) y la telotroca (T), vista lateral. **44.** Detalle de la película de periostraco secretada por la glándula de la concha. 17 h 30 min pf. **45.** Trocófora de 19 hpf, mostrando como la película de periostraco secretado es de mayor tamaño.



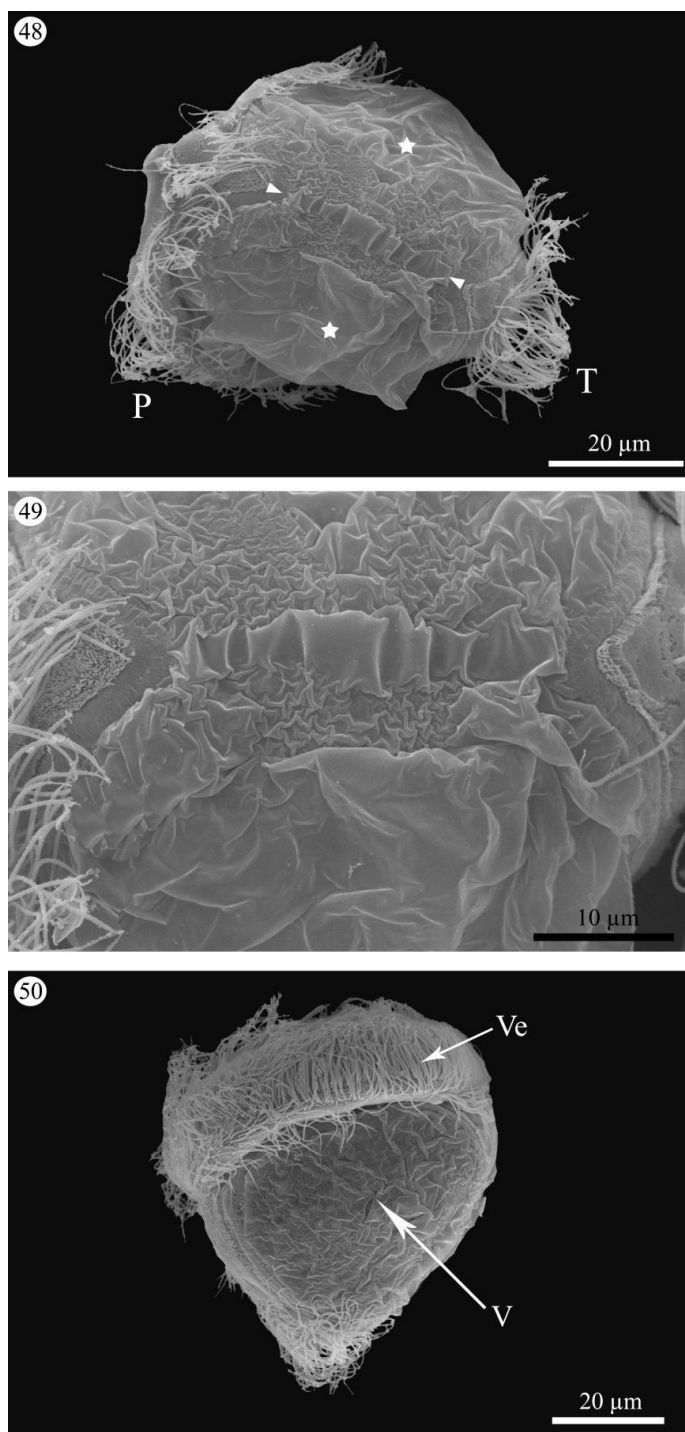
Figuras II. 46-47.- Microfotografías al microscopio electrónico de transmisión del desarrollo embrionario de *R. decussatus*. **46.** Sección sagital de una trocófora tardía (20 hpf), mostrando la invaginación de la concha (flecha curvada), el blastoporo (flecha recta) y el celoma (C). El periostraco (delimitado por triángulos) continúa expandiéndose. Las flechas pequeñas señalan los cilios de la prototroca. **47.** Detalle del periostraco (estrella) depositado sobre las células T3. También se pueden ver las células de la prototroca (Cp).

La larva D veliger, con una talla media de $89,87 \pm 6,55 \mu\text{m}$, aparece a las 26 hpf (Figs. II. 50-52). En este momento, la prodisoconcha I ya recubre todas las partes viscerales de la larva, pero su aspecto todavía es membranoso (Figs. II. 32, 50, 51 y 52). Además, la charnela aparece de mayor tamaño (Figs. II. 52 y 53). Tendrán que pasar 39 hpf hasta que la larva D presente una prodisoconcha calcificada por completo (Figs. II. 57-59). En este estadio, la prototroca se ha transformado en el velo (Figs. II. 34, 50-52 y 57-59), el cual es una corona ciliada ovalada que sirve como órgano locomotor y de alimentación y que lo forman tres bandas diferenciadas de cilios: una, más interna, llamada preoral, una banda adoral y una más externa, llamada postoral (Fig. II. 57). La

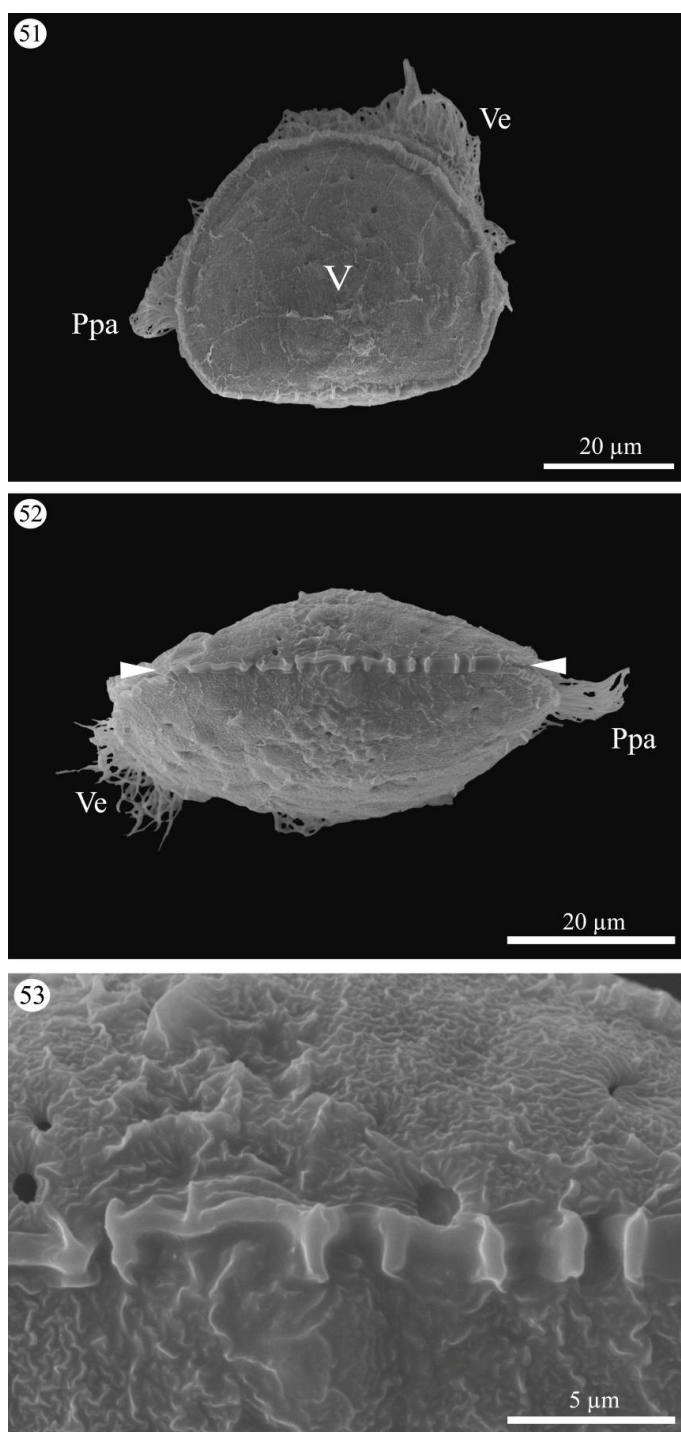
banda preoral consiste en un grupo de largos cilios (20 μm) que forman el anillo más interno y que constituye la parte más visible de la corona del velo. Debajo de esta banda hay otra de cilios más pequeños, la banda adoral. Por último y más externamente, en la parte del velo que está más cerca de la concha, hay una hilera única de cilios de un tamaño similar a los del anillo anterior, los cuales forman la banda postoral.

La larva D ya posee un sistema digestivo completo (Fig. II. 33) y es en este momento cuando comienza la alimentación exógena. Coincidiendo con este evento morfo-fisiológico, empieza la secreción de la prodisoconcha II (PII) al borde la prodisoconcha I (PI). Ambas se diferencian porque la PI tiene un característico aspecto punteado, mientras que la PII está formada por anillos concéntricos de crecimiento (Figs. II. 60 y 61).

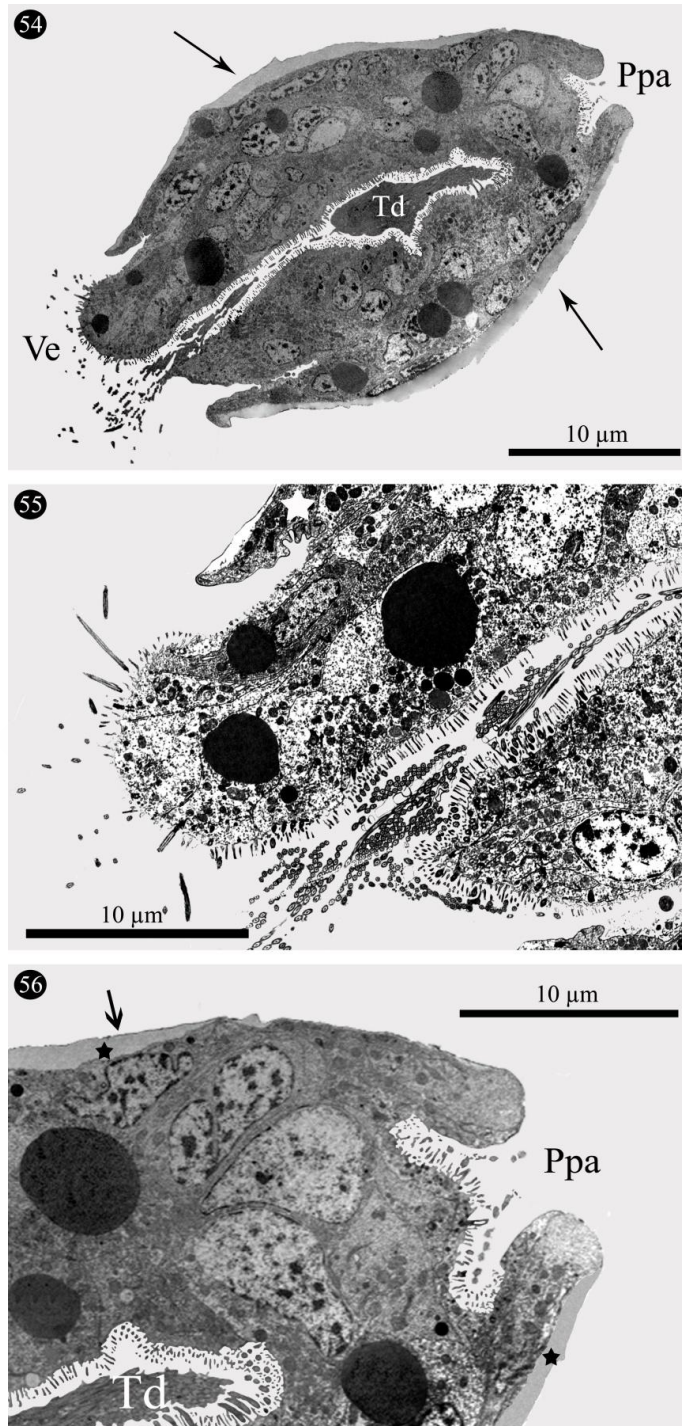
A los 5 dpf la larva comienza a perder esa característica forma de “D”, umbonándose por la zona en la que se encuentra la charnela (Fig. II. 35). Este estadio de larva umbonada (Figs. II. 36, 60 y 61) se alcanza a los 7 dpf, y presenta una longitud media de $138,73 \pm 7,55 \mu\text{m}$. A partir de los 15 dpf se alcanza el estadio de pediveliger (Figs. II. 37, 38 y 62) que mide $180,47 \pm 16,10 \mu\text{m}$ de longitud, en el que coincide el velo y un pie ciliado (Fig. II. 37). Durante este estadio, la larva es capaz de nadar mediante las corrientes creadas por el velo y de reptar gracias al pie.



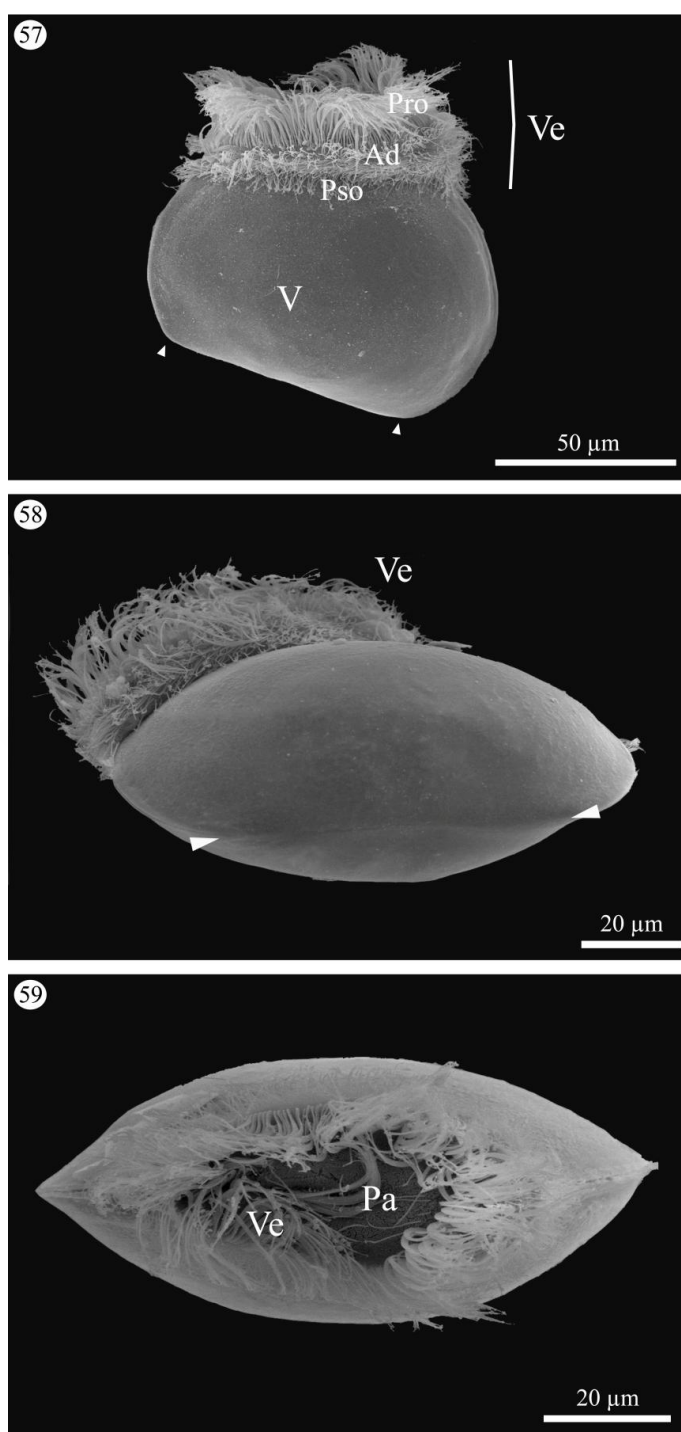
Figuras II. 48-50.- Microfotografías al microscopio electrónico de barrido del desarrollo embrionario y larvario de *R. decussatus*. **48.** Transición de trocófora a larva D veliger, vista desde la charnela (delimitada por triángulos). A ambos lados, se observa el depósito de periostraco (estrellas). También se observa la prototroca (P) y la telotroca (T). **49.** Detalle de la charnela. **50.** Larva D veliger temprana en la que se observa la valva (V) y el velo (Ve), vista lateral.



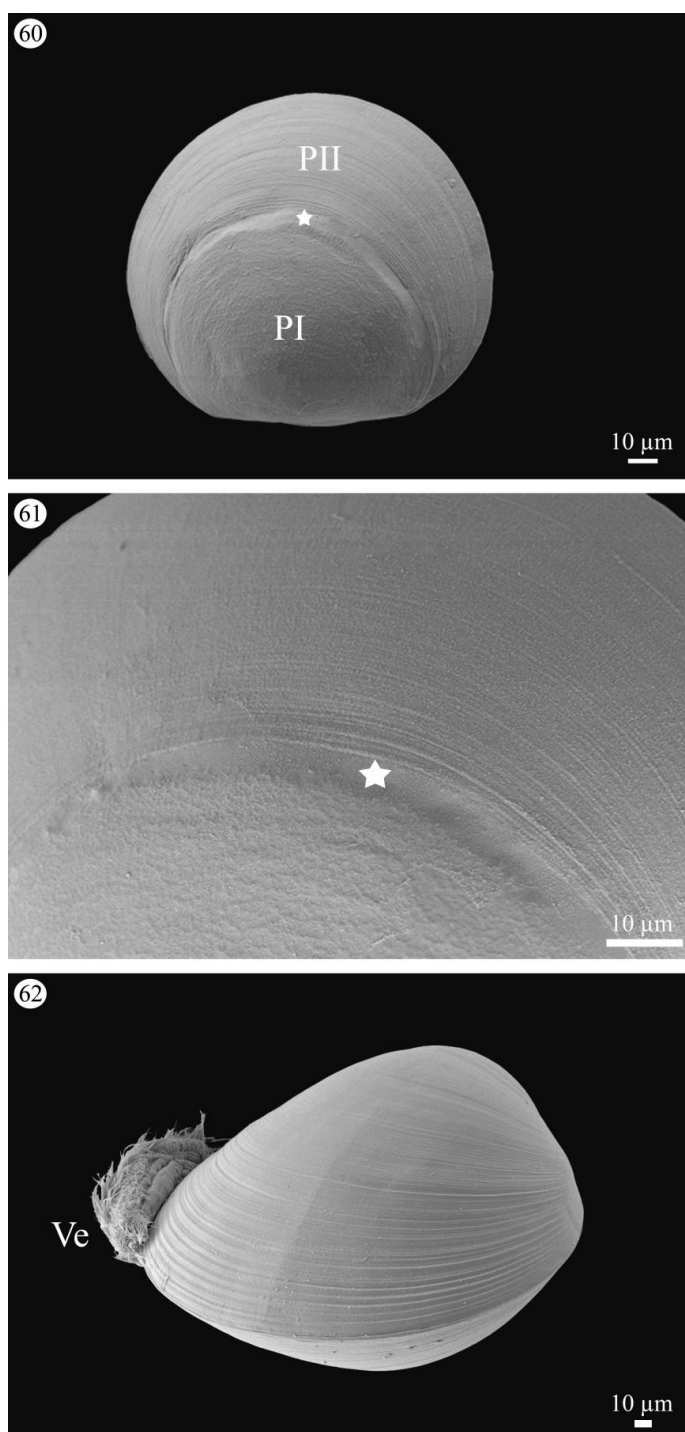
Figuras II. 51-53.- Microfotografías al microscopio electrónico de barrido del desarrollo embrionario y larvario de *R. decussatus*. **51.** Larva D veliger, en la que se observa una valva (V) más calcificada, el velo (Ve) y el penacho post-anal (Ppa). **52.** Vista dorsal de una larva D veliger de 30 hpf mostrando la charnela (delimitada entre triángulos) más desarrollada, el velo (Ve) y el penacho post-anal (Ppa). **53.** Detalle de la charnela en una larva D de 30 hpf.



Figuras II. 54-56.- Microfotografías al microscopio electrónico de transmisión del desarrollo larvario de *R. decussatus*. **54.** Sección transversal de una larva D a las 26 hpf. La nueva concha calcificada (flechas), gris, está cubierta por el periostraco. También se puede observar el velo (Ve), el penacho post-anal (Ppa) y el tracto digestivo (Td) lleno de cilios. **55.** Sección apical de una larva D veliger mostrando el origen del periostraco (estrella) en el borde del manto y las hileras de cilios del velo. **56.** Detalle de la figura 56 mostrando el penacho post-anal (Ppa) y el tracto digestivo (Td). El periostraco (flecha) delimita la concha ya calcificada (estrellas).

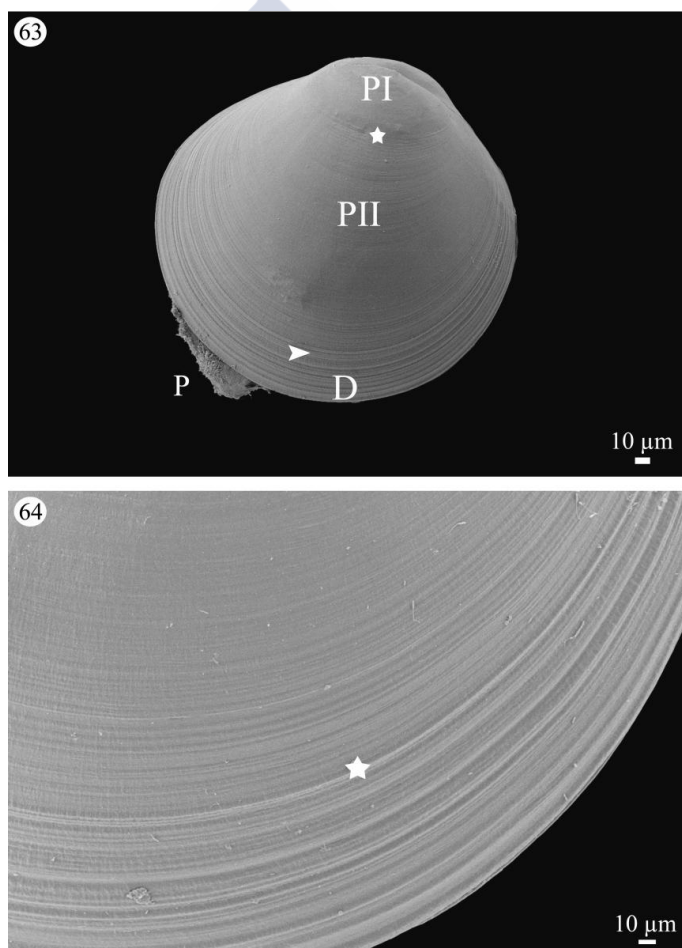


Figuras II. 57-59.- Microfotografías al microscopio electrónico de barrido del desarrollo larvario de *R. decussatus*. **57.** Larva D veliger de 39 hpf. La prodisoconcha I ya cubre la totalidad de la larva. El velo (Ve), extendido entre las valvas (V) de la concha, muestra tres bandas de cilios; post-oral (Pso), adoral (Ad) de cilios cortos, y una más interior llamada pre-oral (Pro) compuesta por largos cirros. La charnela recta está delimitada por triángulos. **58.** Vista dorsal de una larva D mostrando la zona de la charnela (delimitada entre triángulos) y el velo (Ve). **59.** Vista apical de una larva D mostrando la zona del velo (Ve), en cuyo centro aparece el penacho apical (Pa).



Figuras II. 60-62.- Microfotografías al microscopio electrónico de barrido del desarrollo larvario de *R. decussatus*. **60.** Larva veliger, transición de larva D a umbonada, de 5 dpf, en la que se observa la concha totalmente calcificada dividida en dos; la prodisoconcha I (PI) y la prodisoconcha II (PII), ambas separadas por una banda (estrella). **61.** Detalle de la zona de transición entre la prodisoconcha I (región con aspecto granular) y la prodisoconcha II (región con bandas concéntricas). **62.** Estadio pediveliger de 15 dpf mostrando el velo (Ve) pero no el pie.

La fijación ocurre a los 27 dpf con una talla media de $207,64 \pm 15,39 \mu\text{m}$. Durante la metamorfosis, fase crítica del cultivo, el velo se pierde y aparecen los rudimentos branquiales (Fig. II. 39), que mediante un rápido proceso de histogénesis se convertirán en las branquias adultas, mientras que el pie se mantiene (Figs. II. 39 y 63). Cuando concluye la metamorfosis, aparece la postlarva totalmente formada, en la que se diferencia perfectamente la prodisoconcha I, con un aspecto punteado, la prodisoconcha II, con anillos concéntricos, y la disoconcha, que es la concha que se comienza a secretar cuando la larva se transforma en un individuo juvenil. La prodisoconcha II y la disoconcha se diferencian en que la segunda presenta unos anillos concéntricos más marcados y distantes entre sí (Figs. II. 63 y 64).



Figuras II. 63-64.- Microfotografías al microscopio electrónico de barrido del desarrollo larvario de *R. decussatus*. **63.** Vista lateral de una postlarva de 29 dpf mostrando el pie (P). En la superficie de la concha, se observan dos zonas límite: una (estrella) entre la prodisoconcha I (PI) y la prodisoconcha II (PII), y la otra (triángulo) entre la prodisoconcha II y la disoconcha (D). **64.** Detalle del límite entre la prodisoconcha II y la disoconcha (estrella).

DISCUSIÓN

R. decussatus muestra gran similitud en los tiempos de aparición de estadios tempranos, tanto embrionarios como larvarios, cultivados bajo las mismas condiciones con otra especie autóctona de Galicia como es *Venerupis corrugata*, (Cerviño-Otero, *et al.*, 2009; Cerviño-Otero, 2011). Igualmente, los tiempos embrionarios también son similares a aquellos encontrados en otras especies de aguas tropicales de la familia Veneridae, *Anomalocardia flexuosa* (Linnaeus, 1767), *Chione cancellata* (Linnaeus, 1767) (Mouëza, *et al.*, 1999, 2006) y *Tivela mactroides* (Born, 1778) (Silberfeld y Gros, 2006), aunque en estas especies la temperatura de cultivo fue mayor (25°C).

El tamaño medio de los ovocitos de *R. decussatus* en este estudio, es similar al observado para esta especie por otros autores (Pérez-Camacho, *et al.*, 1977; Beiras, *et al.*, 1994; Martínez-Patiño, *et al.*, 2008; Ojea, *et al.*, 2008) y al de otras especies de interés en acuicultura de la familia Veneridae, tales como la almeja japonesa, *R. philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) (Loosanoff y Davis, 1963; Zhang y Yan, 2006; Martínez-Patiño, *et al.*, 2008), la almeja babosa, *V. corrugata* (Martínez-Patiño, *et al.*, 2008; Cerviño-Otero, *et al.*, 2009) y la almeja rubia, *Polititapes rhomboides* (Cerviño-Otero, *et al.*, 2011).

Este estudio muestra las primeras imágenes de gran aumento del espermatozoide maduro de *R. decussatus*. Se caracteriza por poseer una cabeza con forma de trompeta, la cual es ligeramente curvada y un acrosoma alargado. La morfología de la cabeza es diferente de la descrita en otras especies de venéridos, tales como *Gafrarium pectinatum* (Linnaeus, 1758), *Circe scripta* (Linnaeus, 1758), *Pitar sulfureus* (Pilsbry, 1904) y *Macridiscus aequilatera* (G.B. Sowerby I, 1825) (Gwo, *et al.*, 2002), *Chione cancellata* (Mouëza, *et al.*, 2006) y *V. corrugata* (Cerviño-Otero, 2011), pero es similar a la cabeza de los espermatozoides de lucínidos como *Codakia orbicularis* (Linnaeus, 1758) (Mouëza y Frenkiel, 1995; Gros, *et al.*, 1997) y *Lucinoma aequizonata* (Stearns, 1890) (Gros, *et al.*, 1999), sin embargo, la cabeza curvada de los espermatozoides, también es un hecho común en *G. pectinatum*, *C. scripta*, *P. sulfureus*, *M. aequilatera* y *C. cancellata* (Gwo, *et al.*, 2002; Mouëza, *et al.*, 2006), mientras que el espermatozoide de *V. corrugata* tiene una cabeza recta (Cerviño-Otero, 2011). Esta cabeza alargada

representa una modificación del tipo primitivo de espermatozoide, en el cual, la cabeza consta de un núcleo cónico o redondo que está por debajo de un pequeño acrosoma (Franzén, 1955, 1956). A pesar de que su función todavía permanece desconocida, Franzén (1983) sugirió que el núcleo alargado podría estar correlacionado con huevos grandes y con gran cantidad de vitelo que requieren una penetración profunda.

La formación del lóbulo polar en el estadio trébol, parece ser crucial para un desarrollo embrionario normal, y aunque no aparece en algunas especies de bivalvos marinos como *Cumingia* y *Spisula* (Verdonk y van den Biggelaar, 1983), el lóbulo polar está presente en muchas especies de Lamellibranchia como en *Ensis magnus* (Schumacher, 1817) (da Costa, *et al.*, 2008) y *Ensis siliqua* (Linnaeus, 1758) (da Costa, 2009).

Como ocurre en otros bivalvos, tales como *Ensis* (da Costa, 2009), *Spisula*, *Crassostrea*, *Mytilus*, *Pecten*, *Teredo*, *Venus* (Verdonk y van den Biggelaar, 1983) y *Venerupis* (Cerviño-Otero, 2011); en *R. decussatus*, la gastrulación ocurre por epibolia, durante la cual aparecen dos depresiones diferentes, el blastoporo y una hendidura abierta. De acuerdo con Mouëza *et al.* (1999, 2006) y Silberfeld y Gros (2006), que estudiaron pequeños venéridos, en *R. decussatus* la cavidad de la glándula de la concha aparece cuando la gástrula presenta sólo unos pocos cilios. Con el muestreo secuencial empleado en este estudio, se confirma que la diferenciación de la glándula de la concha en *R. decussatus* tiene lugar en el estadio de gástrula, antes de que se complete la formación de la prototroca. Igualmente, Cerviño-Otero (2011) observó el mismo patrón de desarrollo en *V. corrugata*, sin embargo, hay algunos trabajos en desacuerdo con esta teoría, por ejemplo, Eyster y Morse (1984) consideraron que en *Spisula solidissima*, la aparición de la glándula de la concha ocurre en estadios más tardíos como es en la trocófora. Por lo tanto, es necesario realizar más estudios al respecto para averiguar y establecer si esta observación es un evento ampliamente extendido en todas las larvas de bivalvos.

En la actualidad, el conocimiento que se tiene sobre la formación de la concha en bivalvos se basa primariamente en estudios con adultos o semilla (juveniles), pero poco se conoce sobre la formación de la concha de bivalvos antes de la metamorfosis. Es más, como ya hemos visto, hay alguna controversia en la diferenciación de la concha

durante el desarrollo embrionario de los bivalvos. Los primeros estudios al respecto, se basan en el proceso descrito para gasterópodos. Usando este modelo en *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) (Kniprath, 1980) y *Pecten maximus* (Casse *et al.*, 1998), mostraron que la invaginación de la glándula de la concha necesita cerrarse completamente antes de la formación de la concha. Sin embargo, Mouëza *et al.* (2006) empleando MEB y MET, propusieron una interpretación alternativa sobre la diferenciación de la concha en *C. cancellata*, en la cual aparece en el estadio de trocófora como fenómeno independiente. Estos autores señalaron que la glándula de la concha que engloba tanto a las células secretoras de la concha, como a las células secretoras del ligamento, sólo se corresponden con la parte inferior de la gran hendidura y que nunca migran hacia el interior, y mucho menos, forman una invaginación por sí mismas. Más tarde, Raleigh y Keegan (2007) en *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778), y da Costa *et al.* (2008) en *Ensis magnus*, sugirieron que estas especies podían seguir este patrón de diferenciación de la concha, pero la falta de imágenes de MET les impidió confirmarlo, sin embargo, Cerviño-Otero (2011) en *V. corrugata* y da Costa *et al.* (2011) en *E. siliqua*, demostraron que el proceso de diferenciación de la concha en esas especies sigue el modelo propuesto por Mouëza *et al.* (2006). En el presente estudio, el uso combinado de MEB y MET en el venérido *R. decussatus* ha permitido confirmar que la glándula de la concha, en esta especie, aparece en la gástrula temprana y se expande entre la prototroca y la telotroca, y que nunca migra hacia el interior ni forma una invaginación por sí sola. En base a ello, nuestras observaciones estarían también de acuerdo con la interpretación sobre el proceso de diferenciación de la concha propuesto por Mouëza *et al.* (2006).

En la literatura científica, la calcificación de la concha está generalmente asociada con la formación de la prodisoconcha I. Varios autores han puntualizado que la mineralización no se detecta todavía en el estadio de trocófora, pero la larva D posee una concha calcificada (Bellolio *et al.*, 1993; Gros *et al.*, 1997; Casse *et al.*, 1998; Mouëza *et al.*, 2006; Silberfeld and Gros, 2006; da Costa *et al.*, 2008; da Costa, 2009). En *R. decussatus*, la secreción de la prodisoconcha comienza durante la transición de trocófora a larva D, y cuando las larvas alcanzan el estadio que presenta la charnela recta, las valvas, que ya encierran por completo las partes blandas del cuerpo del embrión, están totalmente calcificadas. En el estadio de larva D temprana, se puede observar cómo las valvas, que ya encierran todo el cuerpo del animal, presentan un

aspecto membranoso o arrugado. Se ha sugerido que este aspecto membranoso de la concha en *Tivela mactroides*, es debido a que el material orgánico se calcifica al final del desarrollo embrionario, pocas horas antes de que se alcance el estadio de larva D (Silberfeld y Gros, 2006). El mismo fenómeno se ha observado en *C. cancellata* y se confirmó, mediante observaciones de MET, que había cristales de aragonito entre el manto y el periostraco tras más de 15 horas desde la fertilización (Mouëza *et al.*, 2006). En este trabajo el aspecto arrugado y membranoso de la concha, podría deberse a problemas en el procesado y desecación de la muestras en la cámara de punto crítico, y no a que la concha estuviera sin calcificar. Serían necesarias futuras investigaciones empleando otras técnicas para determinar con exactitud cuándo la concha larvaria de *R. decussatus* se calcifica por completo.

La aparición de una larva pelágica en el ciclo de vida de la mayoría de los moluscos bivalvos marinos va acompañada de una serie de adaptaciones anatómicas, especialmente aquellas asociadas con el velo, y está caracterizada por un rápido desarrollo de la prodisoconcha. Estos rasgos morfológicos permiten a la larva sobrevivir durante largos períodos de tiempo en la columna de agua, siendo el velo una adaptación para la vida planctónica (Cragg, 1989). Existen muchos trabajos sobre el desarrollo temprano de bivalvos marinos en los que se evidencia la presencia de cilios, tanto en alguna parte concreta del embrión o de la larva, como cubriendo toda la superficie (Lebour, 1971; Dinamani, 1974; Moor, 1983; Eyser y Morse, 1984; Hodgson y Burke, 1988; Cragg y Crisp, 1991; Bellolio, *et al.*, 1993; Tardy y Dongard, 1993; Gros, *et al.*, 1997; Casse, *et al.*, 1998; Gros, *et al.*, 1999; Mouëza, *et al.*, 1999; Carriker, 2001; Kang, *et al.*, 2004; Mouëza, *et al.*, 2006; Silberfeld y Gros, 2006; Raleigh y Keegan, 2007), sin embargo, en la mayoría de los casos, los cilios aparecen en estadios del desarrollo embrionario.

Durante el final de la embriogénesis y comienzo del desarrollo larvario de *R. decussatus*, la prototroca de la trocófora se convierte en el velo de la larva veliger. En la prototroca, el conjunto de cilios parece distribuirse aleatoriamente, pero en el velo de las larvas veliger, los cilios siguen un patrón de ordenación (Cragg, 1989). La organización de las bandas de cilios del velo es similar al de otras especies de bivalvos marinos, como son *Ostrea chilensis* (Philippi, 1844) (Chaparro, *et al.*, 1999) y *Pecten maximus* (Cragg, 1989). En *R. decussatus* se ha identificado, en la parte más interna del velo, un

anillo compuesto por largos cilios llamado banda preoral. Una estructura similar se ha descrito en *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) (Waller, 1981), en *Chlamys hastata* (G.B. Sowerby II, 1842) (Hodgson y Burke, 1988), en *Pecten maximus* (Cragg, 1989) y en *O. chilensis* (Chaparro, *et al.*, 1999). Aunque no está clara la función de esta banda, varios autores han señalado que puede estar relacionada con la locomoción y alimentación (Waller, 1981), ya que al ser los cilios de mayor tamaño, su batido genera las principales corrientes de natación (Cragg, 1989). Las otras dos bandas de cilios presentes en el velo de la almeja fina, la banda adoral y la postoral, también han sido identificadas en otros bivalvos, es decir, este patrón de organización ciliar del velo de *R. decussatus* es un rasgo morfológico típico de larvas veliger de moluscos bivalvos.

Otra estructura característica y común de numerosas especies de bivalvos es el penacho apical, aunque hay especies como *O. chilensis* (Chaparro, *et al.*, 1999) y *O. edulis* (Waller, 1981) que carecen de ella. Tardy y Dongard (1993) lo describieron, en *Ruditapes philippinarum*, como un conjunto que consistía en una unidad central, la cual podría funcionar como mecanorreceptor o quimiorreceptor, y otra estructura periférica de función desconocida. De acuerdo con las investigaciones en otras especies de bivalvos (Gros *et al.*, 1997; Mouëza *et al.*, 1999; da Costa *et al.*, 2008; da Costa, 2009; Cerviño-Otero *et al.*, 2011), el penacho apical es una estructura que aparece en el estadio de trocófora. En este trabajo se confirma que en *R. decussatus*, el penacho apical está presente desde el estadio de trocófora hasta el estadio de pediveliger y consecuentemente, es una estructura permanente durante el desarrollo larvario hasta que la metamorfosis a postlarva tiene lugar, cuando será reabsorbido junto al velo.

En *R. decussatus* la superficie de la prodisoconcha I presenta un aspecto punteado o granular, mientras que en la prodisoconcha II se observan líneas de crecimiento concéntricas. Este rasgo ultraestructural se ha observado también en otros venéridos, como *V. corrugata* (Cerviño-Otero, 2011) o *Anomalocardia brasiliana* (Mouëza *et al.*, 1999).

La metamorfosis en *R. decussatus* tuvo lugar a los 27 días (19°C), siendo más tardía que en otras especies como *R. philippinarum* (Aranda-Burgos, *et al.*, 2009b) y *V. corrugata* (Martínez-Patiño, *et al.*, 2001; Cerviño-Otero, 2011), sin embargo, es más

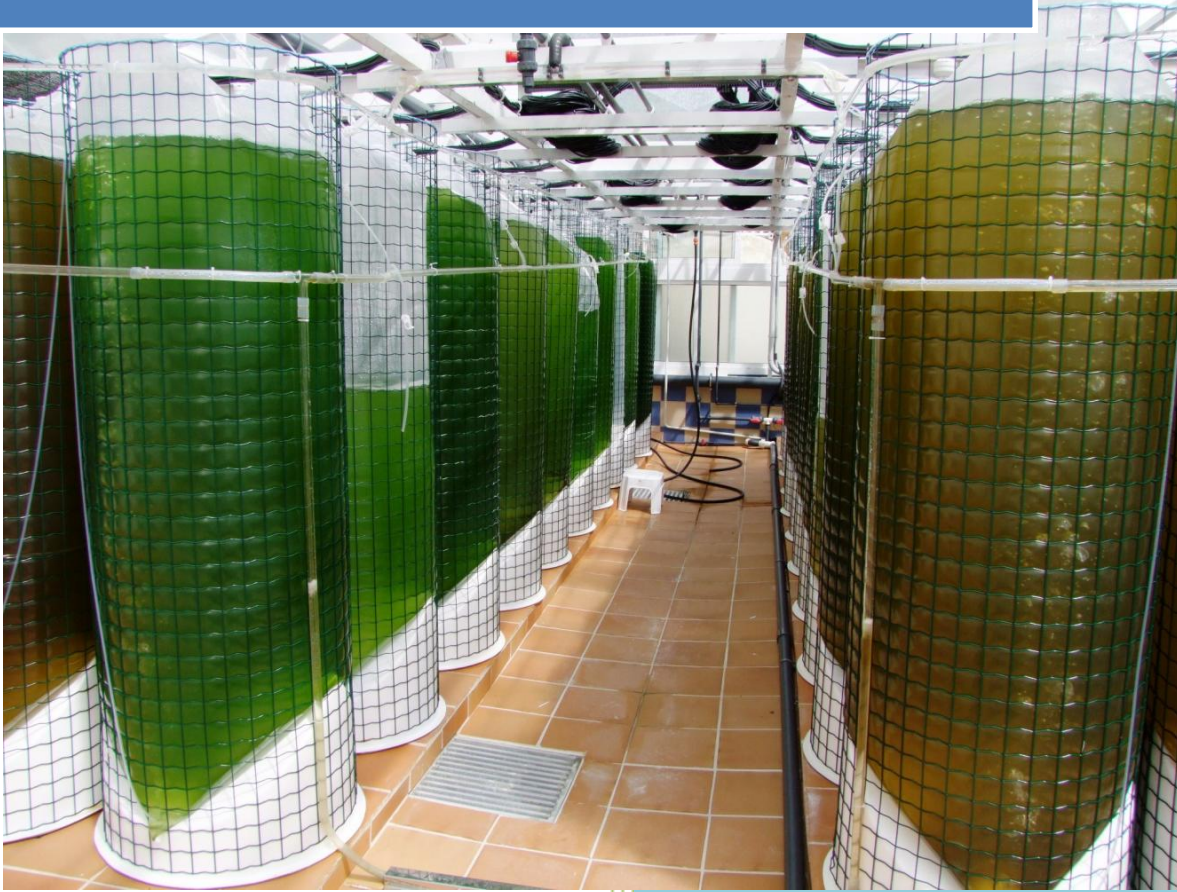
rápida en completar su ciclo larvario que *Donax trunculus* (Linnaeus, 1758) (Aranda-Burgos, *et al.*, 2009a).

Este manuscrito es el primer estudio sobre el desarrollo embrionario y larvario de la almeja fina, *Ruditapes decussatus*, con especial referencia al proceso de diferenciación de la concha, empleando microscopía electrónica de barrido y transmisión. Este trabajo demuestra que la formación de la concha en *R. decussatus* sigue el modelo o teoría propuesto por Mouëza *et al.* (2006), el cual, considerando otros estudios en especies de venéridos o cercanas a Veneracea, podría sugerir que el proceso de formación de la concha sigue un patrón común para estas especies.





Alimentación larvaria





INTRODUCCIÓN

El éxito en el cultivo de moluscos bivalvos en un criadero, depende en gran medida, de la disponibilidad de los nutrientes adecuados en todas sus fases, pero sobre todo en el cultivo larvario. La nutrición es uno de los factores dominantes que influyen en el crecimiento y supervivencia larvaria, y ha sido extensamente revisado por Marshall *et al.* (2010).

A pesar de que se han probado nuevas alternativas alimenticias como levadura, bacterias, microcápsulas (Nóvoa *et al.*, 2002), pastas de microalgas conservadas secas y congeladas (Robert y Trintignac, 1997a), ninguna de ellas está suficientemente avanzada hasta la fecha, como para proporcionar una alternativa real al uso de microalgas vivas. Los nuevos preparados, a menudo ofrecen deficiencias nutricionales e incluso, se acaban convirtiendo en un sustrato propicio para el crecimiento bacteriano (Muller-Feuga, 2000).

Desde que se empezaron a desarrollar las técnicas para el cultivo en criadero de moluscos en la década de 1960, las microalgas se han mantenido como el único alimento óptimo para su empleo rutinario. Aunque durante la fase embrionaria y larvaria los bivalvos pueden utilizar finas partículas de materia orgánica disueltas en el agua (Langdon, 1982; Manahan y Crisp, 1982; Fariás *et al.*, 1998), además de detritus y bacterias asociadas (Helm y Bourne, 2004), tradicionalmente se han empleado las microalgas vivas como alimento para bivalvos en los criaderos de moluscos (Pernet *et al.*, 2003). Los criterios para seleccionar una dieta microalgal adecuada deben estar basados, además de en su valor nutricional, en la forma, la movilidad, el tamaño, la toxicidad y la capacidad de las larvas para atrapar, ingerir, digerir y asimilar esas algas (da Costa *et al.*, 2012). Persoone y Claus (1980) identificaron las especies de microalgas: *Isochrysis galbana*, *Isochrysis* sp. (T-ISO), *Diacronema lutheri*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros calcitrans* (Takano, 1968) y *Skeletonema costatum* (Cleve, 1873), como importantes para la alimentación de bivalvos. Según la clasificación modificada por (De Pauw y Persoone, 1988), estas especies pertenecen a las siguientes clases taxonómicas:

- CLASE BACILLARIOPHYCEAE (DIATOMEAS): *Chaetoceros* sp. y *Skeletonema costatum*.
- CLASE HAPTOPHYCEAE: *Isochrysis galbana*.
- CLASE CHRYSOPHYCEAE: *Diacronema lutheri*.
- CLASE PRASINOPHYCEAE: *Tetraselmis suecica*.

Otro aspecto relevante en la elección de una especie microalgal como alimento en un criadero, es su facilidad de cultivo, es decir, que sea una especie de crecimiento rápido y que alcance elevadas concentraciones de cultivo (Fernández-Pardo, 2011).

El valor nutricional de las especies microalgales, no sólo varía dependiendo de la especie que sea, sino también en función de las condiciones de cultivo y de la fase de crecimiento (Fig. III. 1) en la que se encuentran al ser cosechadas (Enright *et al.*, 1986a; Whyte *et al.*, 1987).

Por lo general, en la alimentación de bivalvos cultivados en criaderos, se ha extendido el empleo de microalgas cosechadas en fase exponencial. En este momento, las microalgas normalmente presentan en torno al 30-40% de proteínas, 10-20% de lípidos y entre el 5-15% de carbohidratos (Brown *et al.*, 1997; Renaud *et al.*, 1999). Cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria, la composición de las microalgas puede cambiar significativamente (Brown, 2002) a la que presentaban en la fase exponencial. Por ejemplo, *Diacronema lutheri* e *Isochrysis* sp. (T.ISO) cosechadas en la fase estacionaria contienen, aproximadamente, de 2 a 4 veces más de carbohidratos y un 30-50% menos de proteínas que las mismas algas cosechadas en la fase exponencial (Brown *et al.*, 1993). Así mismo, la composición lipídica de las microalgas es rica en lípidos polares durante la fase exponencial, mientras que durante la fase estacionaria, acumulan más triacilglicerol (Dunstan *et al.*, 1993). Algunos autores han demostrado que dietas con niveles altos de carbohidratos proporcionan los mejores resultados de crecimiento en juveniles de *Ostrea edulis* (Enright *et al.*, 1986b) y en larvas de *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857) (Whyte *et al.*, 1989) aportándoles también ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en cantidades adecuadas. Por el contrario, Kreeger y Langdon (1993) observaron que en juveniles de *Mytilus trossulus* (Gould, 1850), cantidades altas de proteínas en la dieta proporcionaban los mejores resultados en crecimiento.

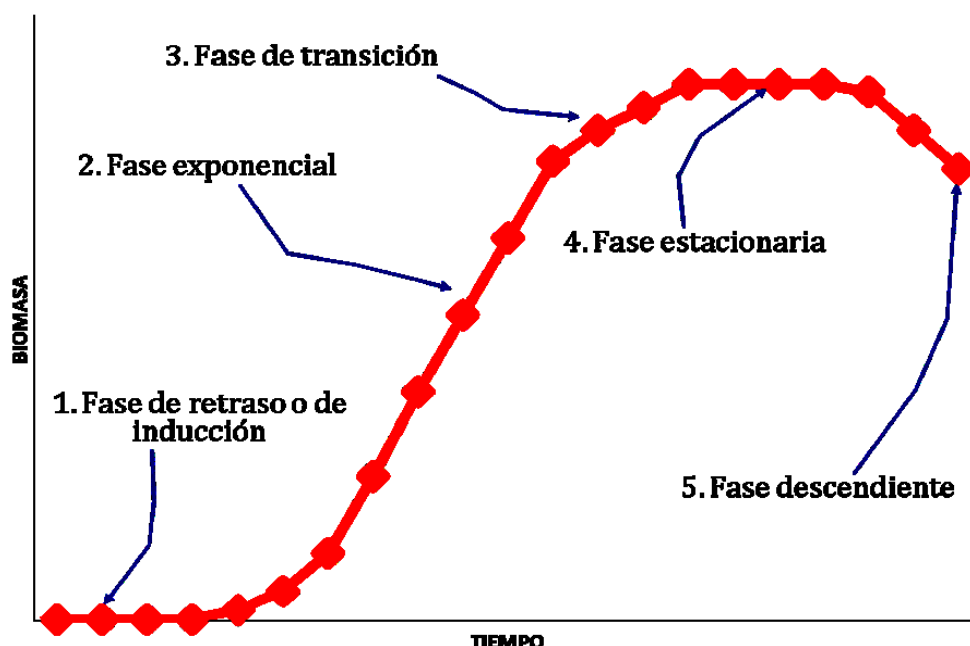


Figura III. 1.- Curva de crecimiento describiendo las cinco fases características del cultivo de fitoplancton.

Es un hecho ampliamente aceptado que las dietas mixtas satisfacen mejor los requerimientos nutricionales de las larvas de moluscos bivalvos, ya que cuando se utilizan regímenes alimenticios monoespecíficos, el crecimiento de las larvas y juveniles de bivalvos marinos es muy variable en función de las especies microalgales empleadas (Enright *et al.*, 1986b; Laing y Millican, 1986; Delaunay *et al.*, 1992). Una combinación de dos o más especies de alto valor nutritivo, que incluya al menos una flagelada y una diatomea de tamaño adecuado, propicia mejores resultados de crecimiento y supervivencia que las dietas monoespecíficas (Helm y Bourne, 2004). En general, se observa que la mezcla de varias especies microalgales tiene un efecto sinérgico sobre el crecimiento de las larvas de bivalvos marinos (Epifanio, 1976), puesto que las diferentes deficiencias, según las especies microalgales empleadas, son compensadas. De todas las especies citadas anteriormente de interés en acuicultura, *Isochrysis galbana* es una especie utilizada a nivel mundial en el cultivo de bivalvos, y junto con *Diacronema lutheri* y *Chaetoceros* sp. son las especies más comúnmente empleadas para alimentar larvas, juveniles y progenitores de bivalvos gracias a sus buenas propiedades nutricionales (Brown, 2002).

El valor nutricional del alimento está determinado principalmente por su composición bioquímica (lípidos, carbohidratos y proteínas). Los constituyentes bioquímicos del alimento aportan los sillares para los procesos anabólicos de formación de tejidos y para la obtención de la energía que precisan los mismos.

Mientras que algunos autores consideran el papel de carbohidratos y lípidos esencial en juveniles de *Ostrea edulis* (Enright *et al.*, 1986b), otros trabajos como los de Farías y Uriarte (2001) y Uriarte *et al.* (2004) muestran que el contenido de proteínas de las microalgas determina en *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) aspectos de fecundidad, duración del período de acondicionamiento, y tasa de crecimiento de la progenie. También existen estudios que subrayan el papel importante de los ácidos grasos poliinsaturados (Helm *et al.*, 1973; Langdon y Waldock, 1981), y otros autores, como Webb y Chu (1982), puntualizan que la importancia de la alimentación suministrada depende más de otros nutrientes (ácidos grasos, aminoácidos, monosacáridos, minerales y vitaminas) que de la composición bioquímica general. Además, la viabilidad de las larvas está limitada por la acumulación y/o utilización de sustratos energéticos, tanto lípidos en *Ostrea edulis* (Helm *et al.*, 1973; Holland y Spencer, 1973) como proteínas durante la metamorfosis en *Magallana gigas* (Thunberg, 1793) (Barlett, 1979) y en *O. edulis* (Rodríguez *et al.*, 1990). Sin embargo, existe cierta controversia con el papel de los carbohidratos como fuente de reserva de las larvas. La mayoría de los trabajos revisados postulan su no utilización (Holland y Spencer, 1973; Gallager y Mann, 1986; Gallager *et al.*, 1986). A pesar de estos, Haws *et al.* (1993) mantienen que los carbohidratos deben jugar un papel en la óptima utilización de otras reservas durante la metamorfosis.

Respecto a los requerimientos lipídicos, la principal fuente energética son los triglicéridos, y en particular, los ácidos grasos de cadena corta y saturados son los que predominantemente se utilizan con fines energéticos, vía β oxidación. Los triglicéridos se acumulan en los lípidos de reserva de los ovocitos durante la vitelogénesis, para que a partir de ellos, se obtenga energía durante la embriogénesis (fase lecitotrófica) (Holland, 1978; Gallager *et al.*, 1986; Utting y Millican, 1997). Asimismo, los triglicéridos acumulados en las larvas, presentan una doble función cuando la larva comienza la alimentación exógena (fase planctotrófica). Por una parte, los ácidos grasos saturados se almacenan como reserva energética y, por otra, sirven como reserva

temporal de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), que pueden ser transferidos a los lípidos polares o a vías metabólicas específicas durante la metamorfosis (Napolitano *et al.*, 1988; Coutteau *et al.*, 1996; Caers *et al.*, 1999c). Este cambio nutricional entre las dos fases (lecitotrófica y planctotrófica) es progresivo, y por lo general, se corresponde con una fase intermedia conocida como mixotrófica, en la que las larvas siguen utilizando las reservas que les quedan procedentes del ovocito, a la par que empiezan a alimentarse externamente. Después de la primera alimentación, y durante unos 4 días, no hay almacenamiento de reservas lipídicas en las larvas, puesto que se está produciendo el paso en endotrofia a exotrofia (da Costa, 2009).

Por otro lado, los requerimientos de esteroides, principalmente colesterol, aportados por las microalgas, en general no son limitantes para el crecimiento larvario (Tremblay *et al.*, 2007). Los bivalvos tienen una capacidad limitada de biosíntesis o conversión de esteroides, aunque son capaces de incorporar selectivamente ciertos esteroides (Soudant *et al.*, 1997).

En larvas de *R. decussatus*, en régimen de ayuno, se han identificado los lípidos neutros como los constituyentes lipídicos más abundantes y su principal fuente energética, seguidos por las proteínas, y con muy poca contribución de los carbohidratos (Matias *et al.*, 2011).

Los lípidos son moléculas biológicas multifuncionales, utilizadas tanto como elementos estructurales de membrana (fosfolípidos y esteroides), conectores que permiten la inserción en membrana de ciertas proteínas, o como metabolitos particularmente ricos en energía (cuando se trata de ácidos grasos o de triacilglicerol). También, son los precursores inmediatos de un gran número de mensajeros intra y extracelulares (eicosanoides, diacilglicerol, fosfoinositoides y esteroides).

Según Christie (1982), los lípidos pueden clasificarse por su composición química y estructural en:

- **Lípidos simples o neutros:**
 - ✓ Acilglicerol
 - ✓ Alquidiacilglicerol y alqueniöldiacilglicerol

- ✓ Esteroles
 - ✓ Ésteres de ceras
 - ✓ Tocoferoles
 - ✓ Ácidos grasos libres
-
- **Lípidos complejos o polares:**
 - ✓ Fosfoglicéridos: uno de los tres componentes mayoritarios de las membranas, junto con el colesterol libre y los fosfoesfingolípidos.
 - ✓ Plasmalógenos polares
 - ✓ Glicerolípidos o glucolípidos
 - ✓ Esfingolípidos

Se puede hacer otra clasificación de los lípidos de acuerdo con su función fisiológica, dividiéndolos en **lípidos de reserva** (triglicéridos fundamentalmente) y **lípidos estructurales** (siendo los mayoritarios los fosfoglicéridos, los esfingolípidos y el colesterol libre). Los lípidos neutros no sólo se relacionan con el éxito del desarrollo larvario de bivalvos, medido en términos de crecimiento, sino también de supervivencia (Gallager *et al.*, 1986). Por otra parte, dentro de los lípidos polares encontramos a los fosfolípidos, que son los constituyentes mayoritarios y están formando parte de todas las membranas biológicas. También se incluye dentro de la fracción polar a las lipoproteínas del huevo, que se aislaron en el bivalvo *Pecten maximus* (Lee, 1991). Éstas juegan un papel importante durante el desarrollo embrionario, proporcionando componentes estructurales y precursores metabólicos al no estar consideradas únicamente como fuentes energéticas para el desarrollo embrionario.

Los ácidos grasos son el constituyente primario de la mayoría de los lípidos cuya estructura es una cadena alifática con un grupo funcional carboxilo (Fig. III. 2).



- **Ácidos grasos saturados (AGS o SAFAs):** sin dobles enlaces.
- **Ácidos grasos monoinsaturados (AGMI o MUFAs):** con un doble enlace.
- **Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI o PUFAs):** con dos o más dobles enlaces, pudiéndose dividir en:

- ✓ Ácidos grasos con menos de 20 átomos de carbono y con hasta 3 dobles enlaces:

Ácido α -linolénico (LNA): 18:3(n-3).

- ✓ Ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs) con más de 20 átomos de carbono y más de tres dobles enlaces:

Ácido eicosapentaenoico (EPA): 20:5(n-3). E

Ácido docosahexaenoico (DHA): 22:6(n-3). E

- ✓ Ácidos grasos no-metilén-interrumpidos (AGNMI): son ácidos grasos con dos (o más) centros de insaturación los cuales no (o no todos) son metilén interrumpidos. Los dobles enlaces están separados por más de un grupo metileno.

E: Ácidos grasos esenciales (EFAs) que no pueden ser biosintetizados por los animales marinos, debiéndose aportar con la dieta, ya que las microalgas marinas sí que tienen la capacidad de biosintetizarlos.

Metabolismo de los ácidos grasos en bivalvos marinos

En general los ácidos grasos, además de obtenerse a partir de la dieta, pueden ser biosintetizados en el citosol de tejidos especializados como el hepático y el adiposo en animales superiores, o sus equivalente (hepatopáncreas) en bivalvos marinos (Nóvoa Vázquez, 2007).

En la figura III. 3, se muestra un esquema simplificado de las rutas biosintéticas de los ácidos grasos en los animales. En el citosol de las células del hepatopáncreas, el acetil-CoA se transforma en malonil-CoA por la acción de la acetil-CoA carboxilasa o ACC, enzima limitante y sometida a regulación hormonal y por diferentes metabolitos. Una molécula de ácido palmítico (16:0) se forma por la condensación de una molécula de acetil-CoA y 7 de malonil-CoA, siendo catalizado el proceso por un complejo multienzimático denominado ácido graso sintetasa o AGS. El ácido palmítico es el precursor de otros ácidos grasos por mecanismos de elongación (incorporación de un par de carbonos a partir del grupo carboxilo), que ocurren en las mitocondrias y por mecanismos de desaturación (formación de dobles enlaces por procesos de oxidación), que suceden en el retículo endoplasmático. Las enzimas implicadas en estos procesos se denominan elongasas y desaturasas.

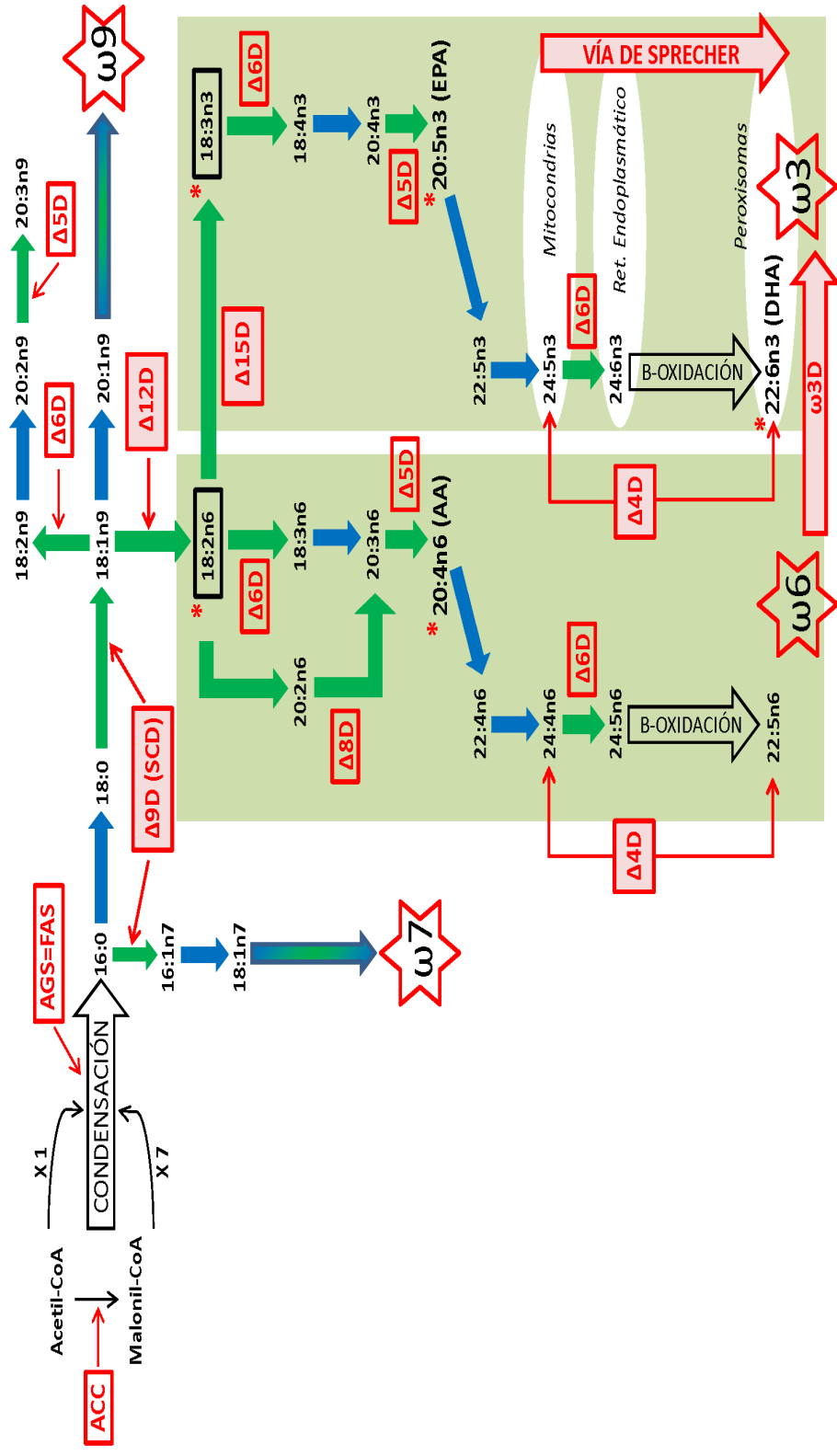


Figura III. 3.- Esquema simplificado de las rutas metabólicas de ácidos grasos. Las flechas azules representan las elongaciones, las verdes las desaturaciones y los asteriscos los ácidos grasos esenciales (EFAs).

El ácido palmitoleico (16:1(n-7)) y el ácido oleico (18:1(n-9)) son los ácidos grasos precursores de las series ω 7 y ω 9, por la acción de la Δ 9-desaturasa (Δ 9D-SCD) sobre el palmitato (16:0) y el estearato (18:0), respectivamente. No existen datos de la actividad SCD en bivalvos marinos, pero la presencia de palmitoleato y oleato, tanto en lípidos polares como en neutros, induce a pensar en un papel activo, tanto en la síntesis de lípidos de membrana como en lípidos de reserva. En consecuencia, viendo la posible regulación de la SCD por factores dietarios, como parece indicar el efecto inhibitorio de los PUFAs, se puede pensar en un efecto negativo de las dietas microalgales con un exceso en el aporte de PUFAs de la serie (n-3) en el crecimiento de las larvas.

Tanto el 18:2(n-6), precursor de la serie ω 6, como el 18:3(n-3), precursor de la serie ω 3, no se pueden biosintetizar al carecer los animales de la maquinaria enzimática necesaria para la introducción de dobles enlaces más allá del carbono 9 (actividades enzimáticas Δ 12 y Δ 15 desaturasas). Por ello, deben ser suministrados por la dieta. Ambos son los precursores de los PUFAs y HUFAs de las series ω 6 y ω 3, siendo su aporte imprescindible para los procesos lipogénicos en los que se requiere la biosíntesis de ácidos grasos de ambas series. Estudios realizados en animales muestran que los EFAs, ácido linoleico (18:2(n-6)) y ácido α -linolénico (18:3(n-3)) procedentes de la dieta, son rápidamente almacenados en triglicéridos del tejido adiposo, actuando éste como un reservorio de EFAs para los procesos lipogénicos (Lin *et al.*, 1993)

Por último, la actividad Δ 3 desaturasa permite transformar ácidos grasos de la serie omega-6 en ácidos grasos de la serie omega-3, introduciendo un doble enlace entre el tercer y cuarto carbono. Esta actividad es inexistente en vertebrados, aunque se encuentra en un rango amplio de organismos (cianobacterias, plantas superiores y nemátodos) (Nakamura y Nara, 2004). Sin embargo, no existen datos en bivalvos marinos que indiquen la posibilidad de biotransformación entre las series de ácidos ω 9, ω 6 y ω 3, y por lo tanto, de la existencia de una actividad Δ 3 desaturasa como tal.

Los EFAs, particularmente los ácidos grasos de tipo omega-3; ácido eicosapentaenoico (20:5(n-3), EPA) y ácido docosahexaenoico (22:6(n-3), DHA), son importantes para el crecimiento y el desarrollo (Langdon y Waldo, 1981), ya que son los principales constituyentes de las membranas (Hendriks *et al.*, 2003) y posibles moduladores de las funciones de las membranas (Palacios *et al.*, 2005). Además, se ha

identificado el ácido graso de la serie omega-6; ácido araquidónico (20:4(n-6), ARA), como potencial modulador del crecimiento y supervivencia de larvas (Pernet *et al.*, 2005) y postlarvas de moluscos bivalvos (Milke *et al.*, 2008). Sin embargo, estos EFAs deben de ser suministrados exogenamente en los moluscos bivalvos debido a su limitada o prácticamente ausente capacidad de síntesis de los mismos (Waldock y Holland, 1984; Laing *et al.*, 1990; Chu y Greaves, 1991).

A pesar de la gran importancia comercial de *R. decussatus*, los estudios basados en sus requerimientos nutricionales son muy escasos. Actualmente, hay poca información sobre dietas para alimentar semilla (Albentosa *et al.*, 1996, 1997; Pérez-Camacho *et al.*, 1998; Fernández-Reiriz *et al.*, 1999, 2006) y larvas (Matias *et al.*, 2011) de esta especie, pero según nuestro conocimiento, no hay estudios previos que traten sobre la composición de ácidos grasos de larvas alimentadas con dietas mono- y pluriespecíficas.

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo es estudiar la composición bioquímica y de ácidos grasos en los lípidos neutros y polares de larvas alimentadas con cuatro dietas distintas, tanto mono- como pluri-específicas, y así determinar el efecto de las mismas en el crecimiento y la supervivencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de microalgas

Las microalgas *Isochrysis galbana*, *Diacronema lutheri* y *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898) se cultivaron en un sistema de producción continua de fitoplancton en bolsas de polietileno de 400 L sujetas por unas mallas de plástico en un invernadero (Fig. III. 4), siguiendo el sistema empleado por SeaSalter Shellfish Company Ltd. (Farrar, 1975). El inóculo empleado para iniciar el cultivo de esas especies microalgales pertenecía a nuestra propia colección y, previamente, se había mantenido en tubos de 20 mL bajo condiciones axénicas en una cámara isoterma. Antes de llevar los inóculos a las bolsas, se transfirieron a frascos Erlemmeyer de 250 mL, y según iba aumentando la concentración de los mismos, se transvasaron a matraces de cristal de 2 L, y después de 6 L. Este proceso se llevó a cabo en una cámara isoterma, en la que la temperatura se mantuvo a $19\pm 1^{\circ}\text{C}$ y los recipientes de cultivo se iluminaron de forma continua a $180\text{-}220\ \mu\text{fotones m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. El agua de mar empleada, con una salinidad de 32-33‰, se filtró a $1\text{-}\mu\text{m}$, se autoclavó a 120°C (temperatura que se mantuvo durante 15 min) y se enriqueció con el medio esterilizado Algal-1 (suministrado por Bionova Científica S. L.). La inoculación en el sistema continuo se realizó con los matraces de 6 L cuando habían alcanzado la fase exponencial de crecimiento. Previamente, el inóculo fue examinado bajo el microscopio para evitar incluir en el cultivo algún tipo de contaminación y, así asegurarnos la pureza del cultivo.

Las bolsas de cultivo se iluminaron mediante luz natural y completada con luz artificial, hasta conseguir un fotoperíodo de 18 horas de luz y 6 de oscuridad. La iluminación artificial se proporcionó mediante lámparas fluorescentes colocadas verticalmente (Philips TL-D) con una intensidad de $180\text{-}220\ \mu\text{fotones m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. El agua empleada en el cultivo, antes de entrar al sistema, se esterilizó por pasteurización a 75°C durante 30 minutos. Se proporcionó aireación continua a cada bolsa para evitar que las algas sedimentasen. Además, se añadió CO_2 mediante burbujeo para mantener el pH entre 7 y 8. El agua de mar empleada, con una salinidad de 32-33‰, se mantuvo a $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ y se enriqueció con la solución C, la cual incluye una mezcla de sales minerales, nitratos y fosfatos. Los nutrientes se añadían de manera constante (1 mL de

medio por cada litro de cultivo algal), mientras que el silicato de sodio, para el cultivo de diatomeas, sólo se añadía al sistema dos días a la semana.

La solución C se preparó con agua destilada y los siguientes compuestos:

- Macronutrientes:
 - NO_3K 80 g L⁻¹
 - $\text{K}_2\text{PO}_4\text{H}$ 16 g L⁻¹

- Micronutrientes:
 - $\text{MnSO}_4+\text{H}_2\text{O}$ 124 mg L⁻¹
 - $\text{Fe}_2\text{S}_3\text{O}_{12}$ 1,2 g L⁻¹
 - $\text{ZnSO}_4+\text{H}_2\text{O}$ 17,6 mg L⁻¹
 - $\text{CoSO}_4+\text{H}_2\text{O}$ 1,6 mg L⁻¹
 - $\text{NaMo}_4+2\text{H}_2\text{O}$ 0,8 mg L⁻¹
 - $\text{CuSO}_4+5\text{H}_2\text{O}$ 1,6 mg L⁻¹

- Quelante:
 - EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 40 g L⁻¹

- Vitaminas:
 - Tiamina 100 mg L⁻¹
 - Cianocobalamina 5 mg L⁻¹
 - Biotina 1,25 mg L⁻¹

Las microalgas se cosecharon cuando el cultivo había alcanzado la fase de crecimiento exponencial, y el cultivo se mantuvo en esta fase durante dos meses con una tasa de dilución de 12,5 L día⁻¹. Antes de ser empleadas como alimento, las células microalgales se contaron con una cámara Bürker-Turk para después preparar las mezclas algales que componen cada dieta y distribuirlas por los tanques de cultivo larvario.

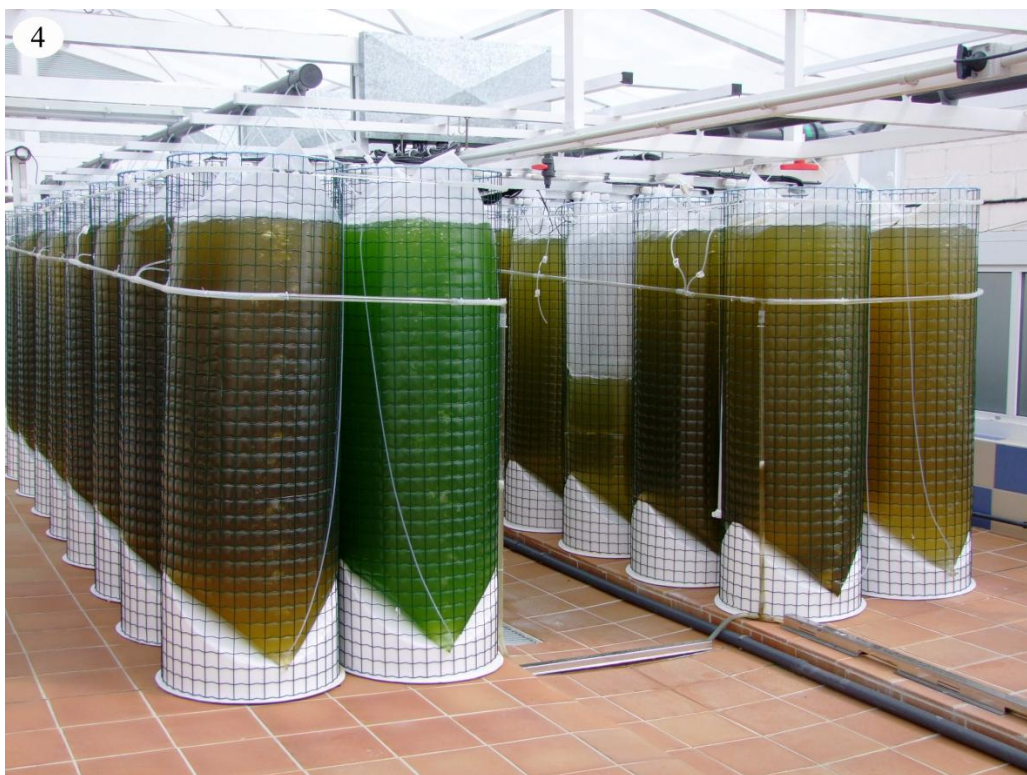


Figura III. 4.- Sistema de cultivo continuo de fitoplancton en bolsas de polietileno de 400 L.

Acondicionamiento de reproductores e inducción a la puesta

Los especímenes adultos de *R. decussatus* se capturaron en junio del 2010 de un banco natural e intermareal de Cambados, en la Ría de Arousa (42°50'N; 08°80'W). Después, este lote de reproductores fue transportado en seco y frío (4°C) hasta el Centro de Cultivos de Ribadeo-CIMA. Una vez allí, los progenitores se acondicionaron en tanques rectangulares de 200 L a $18 \pm 1^\circ\text{C}$ en circuito abierto y con una salinidad de 32-33‰. Como alimento se suministró, de forma continua, una mezcla de *Isochrysis galbana*, *Diacronema lutheri*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros* sp. y *Skeletonema marinoi* en igual proporción, representando la ración diaria el 6% del peso seco de la carne de los reproductores en peso seco de las microalgas.

Para la inducción a la puesta se emplearon 90 almejas de talla comercial (44,8 mm y 18 g de longitud y peso). Primero se preparó a los reproductores limpiando el exterior de sus conchas, y posteriormente se mantuvieron 12 horas en condiciones de seco y frío (4°C). Una vez completado este primer estímulo, se colocaron en una bandeja con agua de mar esterilizada por luz UV. El método de inducción fue el choque

térmico, sometiendo a los progenitores a cambios de temperatura; 2 horas en agua a 25°C, seguidas de 30 minutos a 14°C. Fueron necesarios dos de estos ciclos “caliente-fría” para que las almejas comenzasen a desovar. Además del estímulo térmico, se emplearon otros estímulos adicionales; añadir al agua de inducción tejido gonadal de una de las almejas acondicionadas y fitoplancton. En el momento en el que una de las almejas inducidas comenzó a liberar gametos, ésta fue rápidamente transferida a un receptáculo individual en el que prosiguió con la puesta. Una vez que terminó la puesta, el esperma de varios machos se mezcló en un recipiente, a $20\pm 1^\circ\text{C}$, con los ovocitos obtenidos (50 espermatozoides por ovocito), favoreciendo que la fertilización fuera sincrónica y evitar poliespermia. A los pocos minutos, cuando se constató que la fecundación había ocurrido, se tamizaron los huevos por una malla de 45 μm eliminando así el exceso de esperma. Dos horas más tarde, cuando los embriones habían alcanzado el estadio de 4 células, se transfirieron a los tanques de cultivo larvario de 500 L con agua de mar aireada, filtrada y esterilizada por UV, a una temperatura de $20\pm 1^\circ\text{C}$. La densidad de incubación se ajustó a 35 embriones por mL.

Cultivo larvario

El diseño experimental empleado en el cultivo larvario de esta prueba, se basó en el trabajo rutinario de una hatchery, es decir, se evaluaron los efectos de las dietas en un cultivo larvario intensivo a escala industrial (grandes volúmenes de cultivo y alta densidad) y no en condiciones de laboratorio (pequeños volúmenes y baja densidad de cultivo). El experimento comenzó a día 2 post-fertilización (cuando las larvas alcanzaron el estadio de larva D veliger).

Las larvas D-veliger tempranas se retuvieron en un tamiz con una malla de 60 μm , y se estimó el número total de larvas que habían transformado a larva D. Para ello, las larvas se transfirieron a un vaso de 5 L, y a éste se añadió un volumen conocido de agua de mar. Con una pipeta automática se cogieron cinco muestras de 50 μL , mientras se agitaba el contenido del vaso con un émbolo perforado. Una vez que se contaron las larvas que había en cada submuestra, se estimó el número total de larvas D que habían transformado satisfactoriamente.

Después, las larvas se repartieron aleatoriamente en 8 tanques de 150 L y se ajustó la densidad inicial a 10 larvas por mL. Se probaron cuatro dietas diferentes por duplicado:

- Dieta 1: *Isochrysis galbana*, *Diacronema lutheri* y *Chaetoceros muelleri* (1:1:1, IPC);
- Dieta 2: *I. galbana*, *D. lutheri* y *C. muelleri* (1:1:2, IP2C);
- Dieta 3: *I. galbana* y *D. lutheri* (1:1, IP);
- Dieta 4: *C. muelleri* (C).

La alimentación se suministró diariamente. Al comienzo de la prueba la ración se ajustó a 40 células microalgales por μL , y ésta se fue aumentando según lo demandaban las larvas, hasta alcanzar una ración máxima de 70 células por μL al final del experimento. La ración diaria de comida fue variando en función de la edad del cultivo larvario, pero siempre fue superior a los requerimientos alimenticios encontrados en la literatura (Rico-Villa *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2006).

El agua de cultivo se renovó cada dos días, empleando agua de mar filtrada a 1 μm y esterilizada por UV, y su temperatura se ajustó a $21\pm 1^\circ\text{C}$. La salinidad a lo largo del cultivo larvario fue de $32\pm 1\%$. Se tomaron muestras de larvas D y larvas pediveliger, de cada una de las réplicas, para estimar la supervivencia y el crecimiento. Las larvas se recogieron sobre un tamiz y se midió la longitud de la concha de 100 larvas seleccionadas aleatoriamente de cada tanque mediante un analizador de imágenes (NIS-Elements BR 3.0 Nikon) conectado a un microscopio óptico (Nikon Labophot-2). La supervivencia de las larvas pediveliger se determinó en base al número inicial de larvas D de dos días. A los 22 días, las larvas pediveliger ya estaban listas para fijarse y llevar a cabo la metamorfosis. En este momento terminó el experimento.

Análisis bioquímicos

Recogida y procesado de muestras

Durante la prueba, se tomaron muestras, tanto de las dietas ($n=3$, 80 millones de células por dieta) como de las larvas (20.000 larvas por triplicado a día 2 (larva D) y 10.000, también por triplicado, a día 22, por tanque), para su análisis bioquímico y de

ácidos grasos. Para la recogida de estas muestras se empleó el mismo método que se explicó anteriormente para la estimación de crecimiento y supervivencia larvarios.

Para recoger las muestras de fitoplancton se contó el número de células que contenía la mezcla de cada dieta. Después se centrifugó un volumen conocido que se había lavado previamente con formiato de amonio al 3%, obteniéndose un precipitado microalgal (“pellet”) que se almacenó a -20°C hasta ser liofilizadas. Las larvas se tomaron directamente en tubos, se lavaron con formiato de amonio al 3%, se centrifugaron a 4.000 rpm durante 5 minutos, y por último se les retiró el sobrenadante. Tras este proceso, las muestras se congelaron a -20°C para su posterior liofilización. Las muestras liofilizadas se mantuvieron en desecador durante 1 hora para luego pesarlas en una balanza de precisión Sartorius MC 210S (D.E.=0,01 mg), para así, restarles la tara del tubo y hallar el peso seco del contenido de cada muestra.

Extracción y determinación de lípidos totales

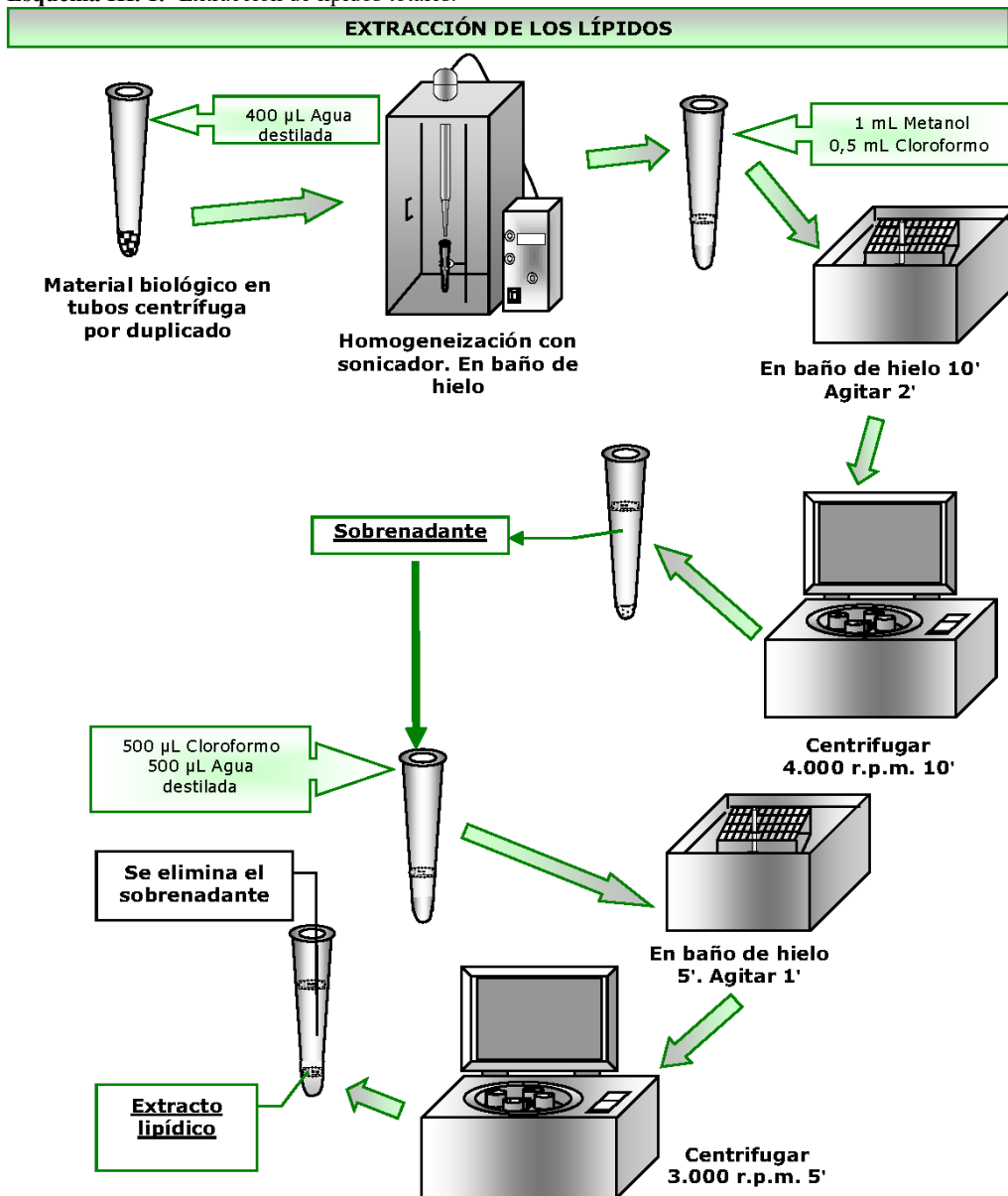
Los lípidos totales se hallan por el método de carbonización mediante el ácido sulfúrico descrito por (Marsh y Weinstein, 1966) utilizando como estándar la tripalmitina en un rango de concentraciones de 5-50 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ para hacer la recta de calibración.

Se parte de las larvas liofilizadas, a las cuales se les añaden 400 μL de agua destilada y se homogeneizan con un sonicador en baño de hielo (Esquema III. 1). Posteriormente, se añade 1 mL de metanol y 500 μL de cloroformo y se deja durante 10 minutos en baño de hielo para, a continuación, agitar 2 minutos cada tubo.

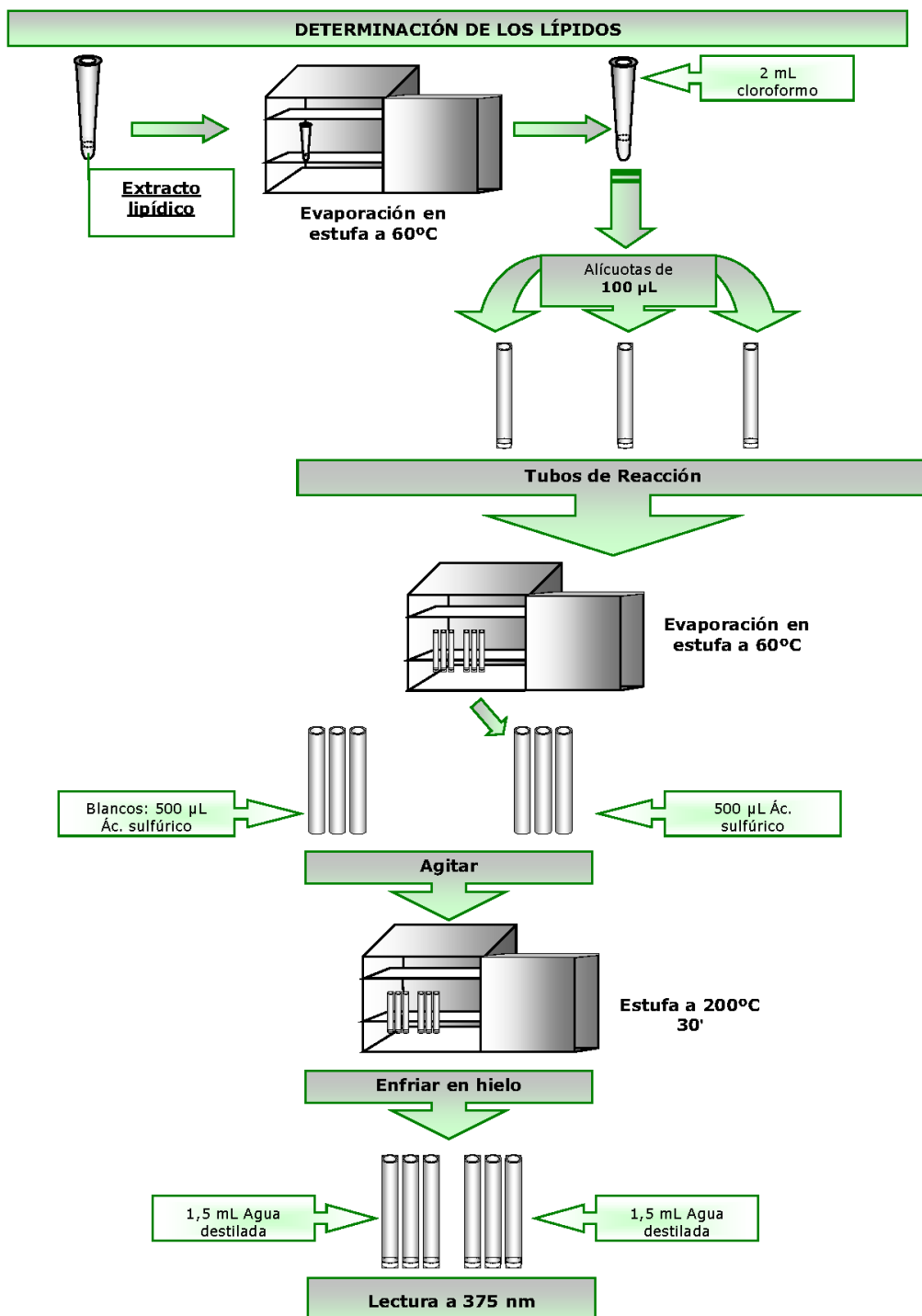
Se centrifuga a 4.000 rpm durante 10 minutos y se recoge el sobrenadante en otro tubo. A cada uno se le añaden 500 μL de cloroformo y 500 μL de agua destilada, manteniéndolos en baño de hielo durante 5 minutos y a continuación, se agitan los tubos. Tras centrifugar a 3.000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se elimina y el pellet que queda en la parte inferior se evapora a 60°C, para redisolverlo en 2 mL de cloroformo. Se toman alícuotas de 100 μL y se vuelven a evaporar a 60°C. Se añaden 500 μL de ácido sulfúrico a los tubos y, a la par, se preparan 3 blancos de ácido sulfúrico. Los tubos se agitan y se mantienen a 200°C durante 30 minutos para luego

enfriarlos en hielo. Se añade 1,5 mL de agua destilada y se lee la absorbancia a 375 nm en un espectrofotómetro (Esquema III. 2).

Esquema III. 1.- Extracción de lípidos totales.



Esquema III. 2.- Determinación de lípidos totales.



Determinación de proteínas totales

Las proteínas se analizaron siguiendo el método modificado de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), basado en los resultados de Bensadoun y Weinstein (1976) y Hess *et al.* (1978). La albúmina de suero bovino, a la cual se le aplicó el mismo tratamiento que a las muestras, se empleó como estándar para realizar la recta de calibración (concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). En el esquema III. 3 se muestra el protocolo empleado.

Se parte de las muestras liofilizadas a las que le añadimos 2 mL de hidróxido sódico (2,5N) para sonicarlas y después mantener durante 30 minutos en un baño a 56°C, y de esta manera, favorecer la hidrólisis de los tejidos. Pasado este tiempo, se mantienen las muestras durante 24 horas a temperatura ambiente y se centrifugan para decantar los restos de los tejidos. Del sobrenadante se recoge una alícuota por triplicado de 100 μL , a la cual le añadimos 450 μL de reactivo I y 600 μL de reactivo II:

Reactivo I:

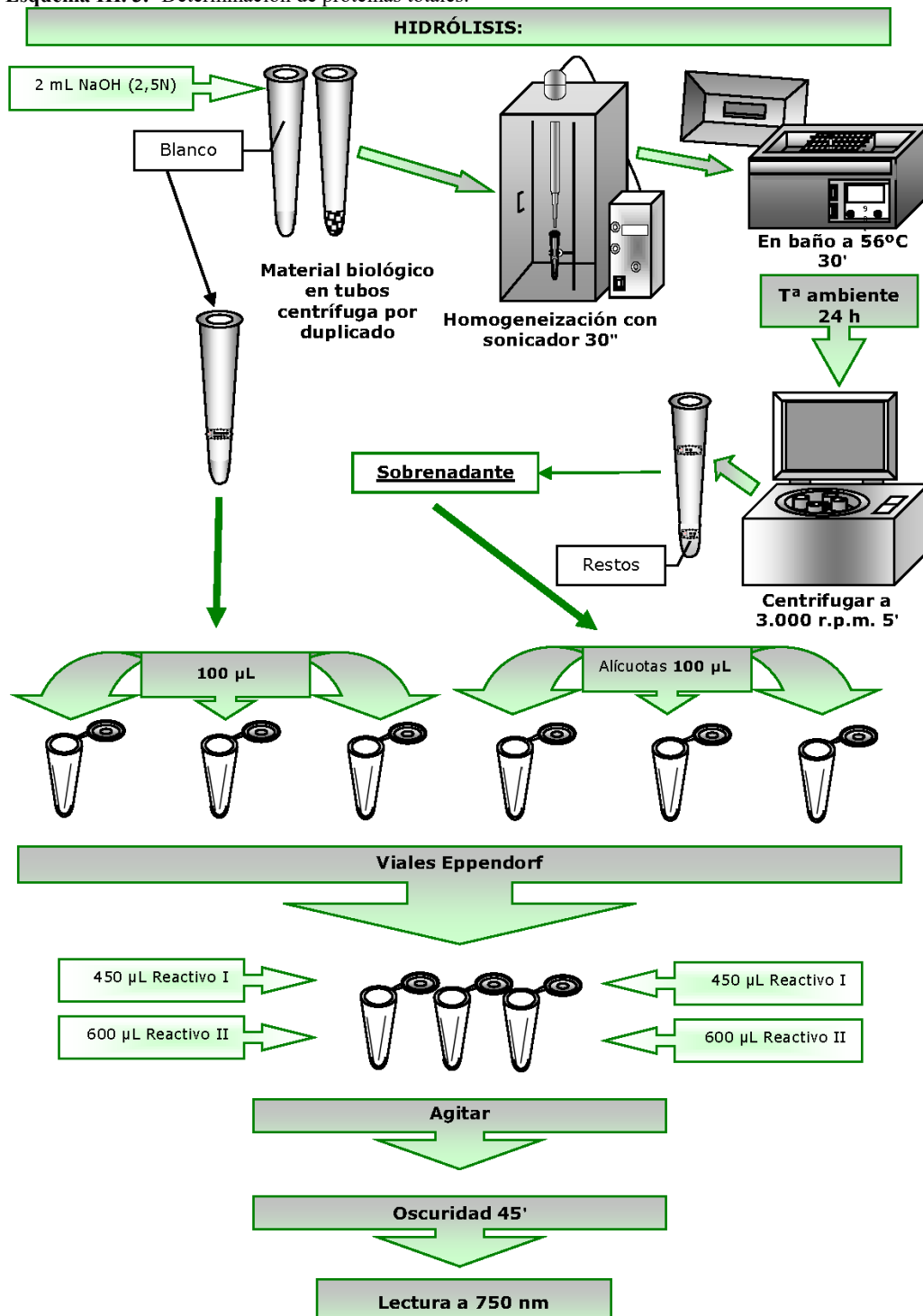
- ✓ 25 volúmenes de NaOH (0,8N)
- ✓ 18 volúmenes de reactivo A:
 - 0,2 g de tartrato disódico
 - 10 g de carbonato sódico
 - 69 mL de NaOH (0,8N) enrasados a 100 mL de agua destilada
- ✓ 2 volúmenes de reactivo B:
 - 2 g de tartrato disódico
 - 1 g de sulfato de cobre (II)
 - 12,5 mL de NaOH (0,8N) enrasados a 100 mL de agua destilada

Reactivo II:

- ✓ 1 volumen del reactivo del fenol (Folin-Ciocalteu)
- ✓ 2 volúmenes de agua destilada

Los tubos se agitan vigorosamente y se dejan incubar durante 45 minutos en oscuridad. Luego se lee la absorbancia en un espectrofotómetro a 750 nm.

Esquema III. 3.- Determinación de proteínas totales.



Determinación de carbohidratos totales

Para cuantificar los carbohidratos totales se siguió el método de la antrona descrito por Fraga (1956), y en el que se empleó como estándar la D(+) glucosa, en un rango de concentraciones de 15-105 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, para obtener la recta de calibración.

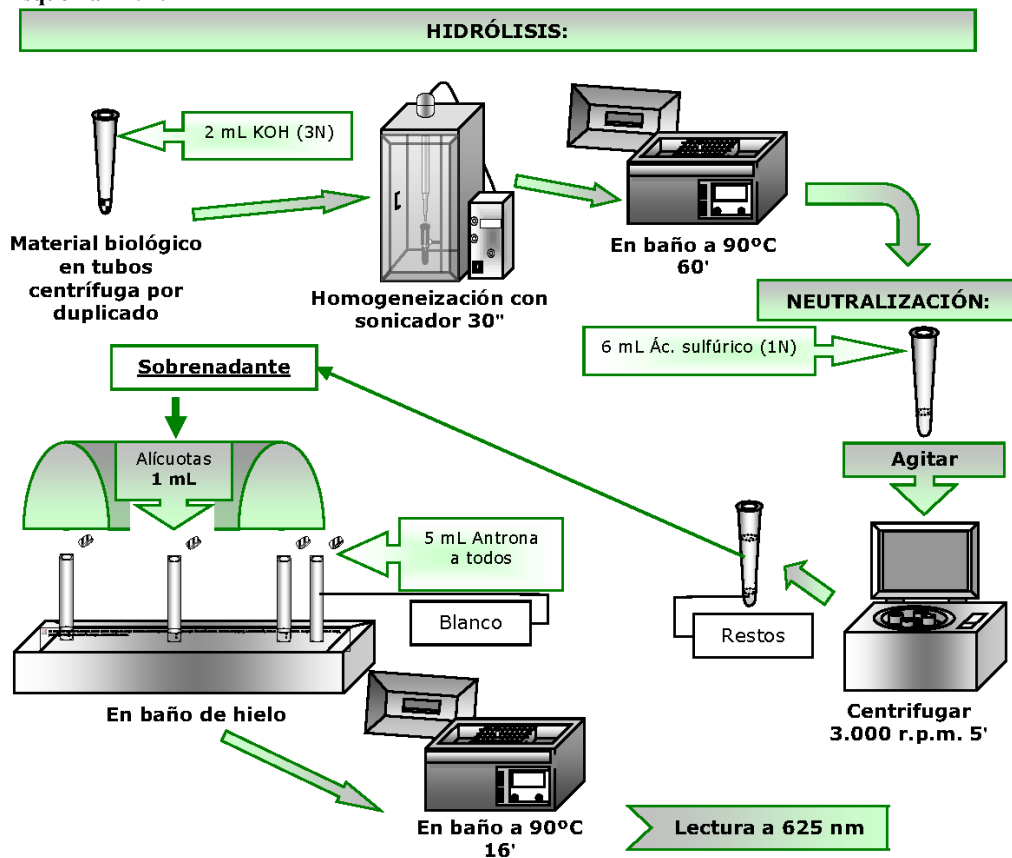
A las muestras liofilizadas se les añaden 2 mL de hidróxido potásico (Kim *et al.* 1999), se hidrolizan y homogeneizan con un sonicador durante 30 segundos y después se mantienen en un baño a 90°C durante una hora (Esquema III. 4). El siguiente paso es la neutralización con 6 mL de ácido sulfúrico (1N), se agita y se centrifuga a 3.000 rpm durante 5 minutos. Del sobrenadante se toman 3 alícuotas de 1 mL, y se les añaden, en un baño de hielo, 5 mL del reactivo de antrona. Paralelamente se preparan tres blancos sólo de antrona. Las muestras se agitan y se bañan a 90°C durante 16 minutos. Se dejan enfriar y se leen a 625 nm en espectrofotómetro.

Análisis de ácidos grasos

Recogida y procesado de muestras

Tanto las tres muestras de las dietas, como las dos muestras de larvas, se recogieron en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F de 4,5 cm de diámetro, previamente horneados en una mufla a 450°C durante 24 horas. Se lavaron las sales con formiato de amonio al 3%. Los filtros con la muestra, se transfirieron a tubos de vidrio a los que se añadieron 6 mL de cloroformo-metanol (2:1, v/v) y se almacenaron a -20°C, previo burbujeo con nitrógeno. Es importante destacar que las muestras de las mezclas de fitoplancton se cosecharon cuando sus cultivos se encontraban en la fase exponencial de crecimiento.

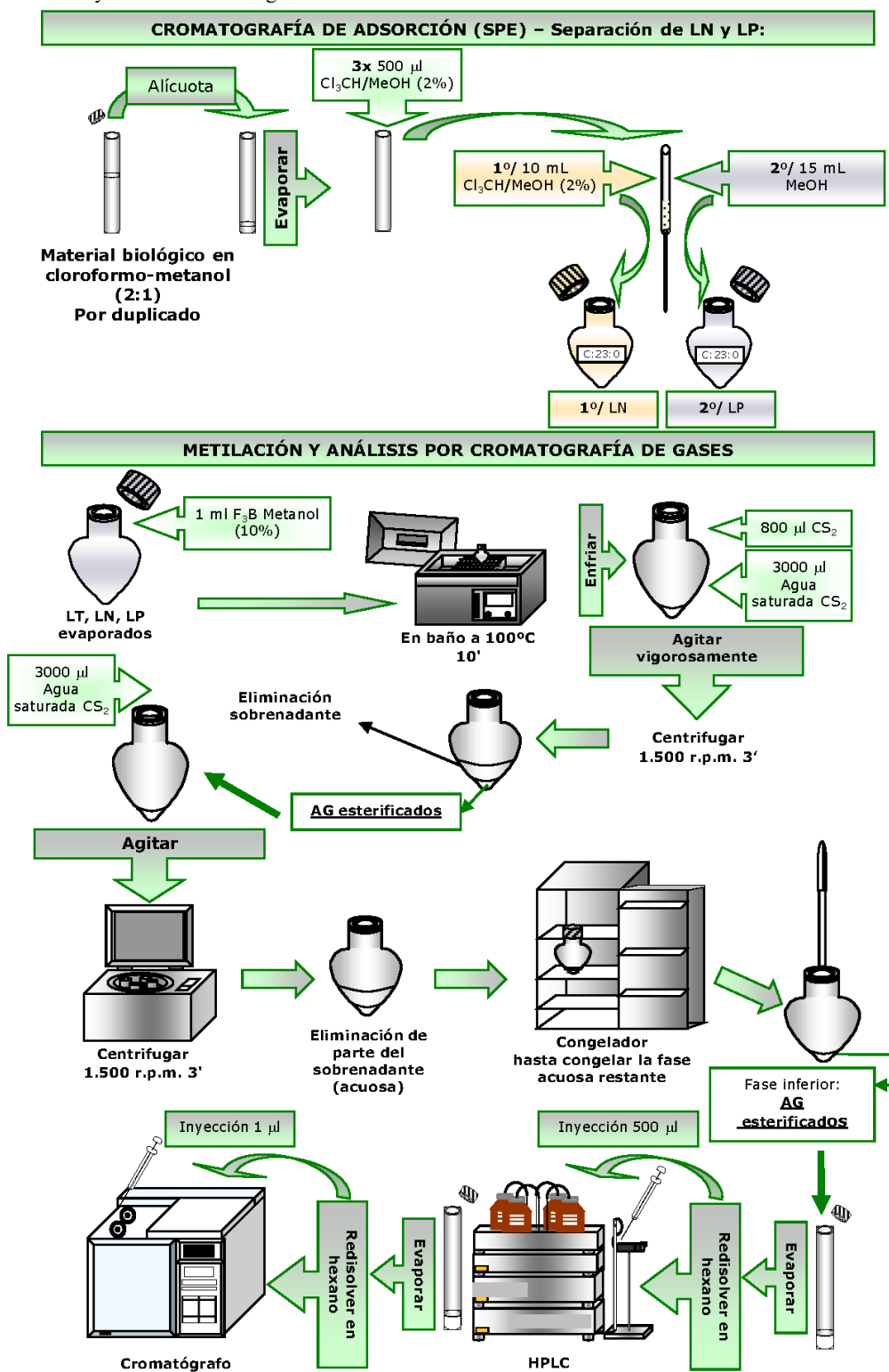
Esquema III. 4.- Determinación de carbohidratos totales.



Determinación y cuantificación de ácidos grasos

Las alícuotas de las muestras de microalgas y larvas se sometieron al método de determinación y cuantificación de ácidos grasos descrito por Marty *et al.* (1992). En las muestras de fitoplancton los ácidos grasos se determinaron sólo de los lípidos totales, mientras que en las muestras de larvas, se determinaron tanto en la fracción neutra como en la polar. A efectos del tratamiento de las muestras, esta diferencia se traduce en que para las muestras de las dietas no se llevará a cabo la primera etapa de Cromatografía de Adsorción, en la cual se separan ambas fracciones lipídicas. Las distintas etapas de este protocolo se resumen en el esquema III. 5.

Esquema III. 5.- Determinación de ácidos grasos. Separación en familias de lípidos neutros y polares, metilación y análisis de ácidos grasos.



La primera fase del protocolo fue separar fraccionalmente los lípidos neutros (triglicéridos y esteroides) y posteriormente, los lípidos polares (fosfolípidos), mediante una cromatografía SPE (Solid Phase Extractive). En esta fase se emplearon sucesivamente solventes de distinta polaridad (cloroformo-metanol (98:2) y metanol) para extraer en un soporte sólido (pipeta Pasteur (35x5 mm) rellena de gel de sílice al 6% (w/w), previamente incinerada a 450°C (24 horas) e hidratada al 6% con agua ultrapura).

Los ácidos grasos debido a su alta polaridad, poseen un elevado punto de ebullición y lenta elución, con lo que no se pueden inyectar directamente al cromatógrafo, sino que antes hay esterificarlos. Es decir, hay que proporcionar a cada ácido graso un grupo metilo que les confiera menor polaridad y mayor volatilidad.

Por lo tanto, las muestras fueron metiladas, y así se obtuvieron los ésteres metílicos de los ácidos grasos. La transesterificación se llevó a cabo, con el reactivo trifluoruro de boro-metanol (10% m/m) con ciertas modificaciones al método propuesto por Metcalfe y Schmitz (1961). Una vez esterificados, los ácidos grasos se extrajeron con hexano. La fase orgánica obtenida, que contiene los ácidos grasos esterificados, se evaporó bajo flujo constante de nitrógeno. Se resuspendió en un volumen conocido de hexano y se inyectó 1 µL en el cromatógrafo de gases.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos se analizaron en un cromatógrafo de gases Varian 38003800, equipado con un inyector tipo “on-column” y un detector de ionización de llama (FID). Se empleó H₂ como gas vehículo a una presión inicial de 80 kPa. Además la columna capilar que se empleó fue una DB-WAX. 122-7032 (30 m/0,25 mm ID/0,25 Fm. 260 °C).

El horno se programó para que fuera elevando la temperatura según se indica a continuación:

1. Temperatura inicial 60°C durante 2 minutos.
2. Incrementar de 60°C a 160°C (50°C/minuto), y permanecer así durante 2 minutos.
3. Incrementar de 160°C a 170°C (1,5°C/minuto).
4. Incrementar de 170°C a 185°C (2°C/minuto).

5. Incrementar de 185°C a 240°C (3°C/minuto).
6. Permanecer hasta el final del proceso a 240°C.

Los picos obtenidos en el cromatograma resultante se identificaron comparando sus tiempos de retención con el patrón estándar (Sigma® 189-19). Como estándares, para la identificación y cuantificación, se emplearon: mezcla de 37 ácidos grasos metilados, Sigma® 189-19 y como patrón interno, el ácido tricosanoico (C23:0), Sigma® T-6543, que no se encuentra presente en los organismos marinos. La cuantificación de los distintos ácidos grasos se hace mediante la construcción de rectas de calibración del patrón estándar. Se calculó un factor de respuesta para cada ácido graso que nos sirviera para llevar a cabo los análisis cuantitativos. Los principales ácidos grasos identificados por el método empleado, se exponen en la tabla III. 1.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS® para Windows versión 15.0. Para el estudio de la normalidad se empleó el test de Shapiro-Wilk, y el análisis de las varianzas, en los casos en los que las diferencias eran significativas, se realizó mediante un ANOVA. La homogeneidad de varianzas se comprobó mediante el test de Barlett. Cuando fue necesario, se aplicaron análisis *post hoc* con test LSD. Los datos de longitud se transformaron a valores logarítmicos para normalizar la varianza. Para la comparación de los datos en porcentajes, y para evitar trabajar con ellos, los valores fueron transformados con una función arcoseno (Sokal y Rohlf, 1995). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si $p \leq 0,05$.

Las correlaciones entre el crecimiento (talla de la concha) o la supervivencia de las larvas de 22 días y su composición bioquímica y de ácidos grasos con la dieta, se examinaron utilizando el coeficiente de correlación de Pearson del paquete estadístico SPSS® 15.0.

Tabla III. 1.- Principales ácidos grasos identificados y separados.

Fórmula abreviada	Nomenclatura química	Nombre común
12:0	Ác. Dodecanoico	Ác. Láurico
13:0	Ác. Tridecanoico	
14:0	Ác. Tetradecanoico	Ác. Mirístico
15:0	Ác. Pentadecanoico	
16:0	Ác. Hexadecanoico	Ác. Palmítico
17:0	Ác. Heptadecanoico	Ác. Margárico
18:0	Ác. Octadecanoico	Ác. Esteárico
19:0	Ác. Nonadecanoico	
23:0	Ác. Tricosanoico	
16:0 dma	Ác. Hexadecanoico dimetil acetal	
17:0 dma	Ác. Heptadecanoico dimetil acetal	
18:0 dma	Ác. Octadecanoico dimetil acetal	
16:1(n-5)	Ác. 11-hexadecenoico	
16:1(n-7)	Ác. 9-hexadecenoico	
16:1(n-9)	Ác. 7-hexadecenoico	Ác. Palmitoleico
18:1(n-7)	Ác. 11-octadecenoico	Ác. Vaccénico
18:1(n-9)	Ác. 9-octadecenoico	Ác. Oleico
20:1(n-7)	Ác. 13-eicosenoico	
20:1(n-9)	Ác. 11-eicosenoico	
20:1(n-11)	Ác. 9-eicosenoico	
18:2(n-6)	Ác. 9,12-octadecadienoico	Ác. Linoleico
18:3(n-3)	Ác. 9,12,15-octadecatrienoico	Ác. α -linolénico
18:3(n-6)	Ác. 6,9,12-octadecatrienoico	Ác. γ -linolénico
18:4(n-3)	Ác. 6,9,12,15-octadecatetraenoico	
21:4(n-6)	Ác. 6,9,12,15-heneicosatetraenoico	
21:5(n-3)	Ác. 6,9,12,15,18-heneicosapentaenoico	
20:2(n-6)	Ác. 11,14-eicosadienoico	
20:3(n-3)	Ác. 11,14,17-eicosatrienoico	Ác. Homogamma linolénico
20:3(n-6)	Ác. 8,11,14-eicosatrienoico	Ác. Dihomo linolénico
20:4(n-6)	Ác. 5,8,11,14-eicosatetraenoico	Ác. Araquidónico (ARA)
20:5(n-3)	Ác. 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	Ác. Eicosapentaenoico (EPA)
22:4(n-6)	Ác. 7,10,13,16-docosatetraenoico	
22:5(n-6)	Ác. 4,7,10,13,16-docosapentaenoico	Ác. Docosapentaenoico
22:5(n-3)	Ác. 7,10,13,16,19-docosapentaenoico	Ác. Clupanodoico
22:6(n-3)	Ác. 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	Ác. Docosahexaenoico (DHA)
20:2i	Ácido graso no saturado no-metilén-interrumpido NMIFAS	
20:2j	Ácido graso no saturado no-metilén-interrumpido NMIFAS	
22:2i	Ácido graso no saturado no-metilén-interrumpido NMIFAS	
22:2j	Ácido graso no saturado no-metilén-interrumpido NMIFAS	

RESULTADOS

Crecimiento y supervivencia larvaria

Los mejores resultados en cuanto a tasa de crecimiento y longitud alcanzada a los 22 días, momento de la fijación, se consiguieron con las dietas que contenían *Chaetoceros* (IPC, IP2C y C), mientras que las larvas alimentadas con la dieta 3 (IP) mostraron el crecimiento más bajo ($p \leq 0,001$). (Tabla III. 2).

Tabla III. 2.- Longitud media y supervivencia, a día 22 de cultivo, de larvas de *R. decussatus* alimentadas con las cuatro dietas ensayadas. Tasa de crecimiento diaria alcanzada con cada dieta. C: dieta *C. muelleri*; IP: dieta *I. galbana* y *P. lutheri* (1:1); IPC: dieta *I. galbana*, *P. lutheri* y *C. muelleri* (1:1:1); IP2C: dieta *I. galbana*, *D. lutheri* y *C. muelleri* (1:1:2). Los resultados se expresan como media±desviación estándar. Los valores de la misma columna con distinta letra son diferentes ($p < 0,05$).

Dietas	Longitud (μm)	Tasa de crecimiento (μm día ⁻¹)	Supervivencia (%)
IPC	223,5±13,4 ^{ab}	6,9	27,1±0,0 ^a
IP2C	217,1±21,4 ^b	6,7	32,0±0,0 ^a
IP	201,2±10,3 ^c	5,9	8,1±0,0 ^b
C	228,0±14,4 ^a	7,3	25,0±0,1 ^a

La mayor supervivencia prefijación (día 22) también la presentaron las larvas alimentadas con dietas que contenían *Chaetoceros* (IPC, IP2C y C) aunque no había diferencias significativas entre ellas, presentando valores entre 24,9 y 31,5% (Tabla III. 2). Por el contrario, la supervivencia más baja se observó en las larvas alimentadas con la dieta IP (8,1%), siendo significativamente diferente al resto de los grupos mencionados ($p = 0,000$).

Composición bioquímica y de ácidos grasos de las dietas ensayadas

Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de proteínas ($p = 0,000$) y lípidos totales de las dietas ($p = 0,000$) (Figura III. 5. A). Las dietas IP e IPC presentaron mayor proporción de lípidos totales que las dietas IP2C y C ($p < 0,05$). Por el contrario, estas últimas presentaron un porcentaje de proteínas significativamente mayor que el resto de las dietas ($p < 0,05$). En cuanto al contenido en carbohidratos, no se encontraron diferencias significativas entre las dietas estudiadas ($p > 0,05$).

En la tabla III. 3 se muestra la composición en ácidos grasos de las cuatro dietas experimentales. Las dietas que contenían las especies *I. galbana* y *D. lutheri* (IPC, IP2C e IP) se caracterizaron por el predominio de los ácidos 14:0, 16:0, 16:1(n-7), 18:1(n-9),

Tabla III. 3.- Composición de ácidos grasos en porcentajes del contenido de lípidos totales de las cuatro dietas ensayadas (valores expresados como media \pm desviación estándar). C: dieta *C. muelleri*; IP: dieta *I. galbana* y *D. lutheri* (1:1); IPC: dieta *I. galbana*, *D. lutheri* y *C. muelleri* (1:1:1); IP2C: dieta *I. galbana*, *D. lutheri* y *C. muelleri* (1:1:2). Los valores de la misma fila con diferente letra son diferentes ($p < 0,05$).

	IPC	IP2C	IP	C
14:0	21,0 \pm 1,6 ^{ab}	21,5 \pm 6,9 ^{ab}	16,0 \pm 2,1 ^b	26,0 \pm 5,3 ^a
16:0	11,1 \pm 1,6 ^a	14,6 \pm 9,5 ^a	16,7 \pm 5,7 ^a	10,9 \pm 5,5 ^a
18:0	1,2 \pm 0,5 ^a	1,8 \pm 1,8 ^a	1,6 \pm 1,3 ^a	1,9 \pm 1,1 ^a
16:1(n-7)	12,2 \pm 0,8 ^b	12,1 \pm 3,0 ^b	7,0 \pm 1,7 ^c	16,6 \pm 3,9 ^a
18:1(n-9)	6,3 \pm 1,6 ^a	7,8 \pm 5,7 ^a	11,2 \pm 7,9 ^a	3,5 \pm 2,0 ^a
18:1(n-7)	1,6 \pm 0,2 ^a	2,2 \pm 0,3 ^a	1,5 \pm 0,3 ^a	2,6 \pm 1,2 ^a
16:2(n-7)	0,9 \pm 0,4 ^b	0,9 \pm 0,2 ^b	0,0 \pm 0,0 ^c	1,7 \pm 0,5 ^a
16:2(n-4)	1,6 \pm 0,4 ^a	1,5 \pm 0,2 ^a	0,9 \pm 0,2 ^b	1,7 \pm 0,2 ^a
16:3(n-6)	0,9 \pm 0,2 ^b	0,9 \pm 0,2 ^b	0,2 \pm 0,0 ^c	2,0 \pm 0,7 ^a
16:3(n-4)	3,3 \pm 2,3 ^a	3,2 \pm 2,2 ^a	0,1 \pm 0,0 ^b	5,2 \pm 0,7 ^a
18:2(n-6)	3,0 \pm 0,9 ^a	2,4 \pm 0,2 ^a	3,1 \pm 0,3 ^a	1,4 \pm 0,3 ^b
18:3(n-6)	1,1 \pm 0,2 ^a	1,0 \pm 0,3 ^a	0,7 \pm 0,3 ^a	1,5 \pm 0,5 ^a
18:3(n-3)	3,6 \pm 1,6 ^a	3,0 \pm 1,9 ^a	4,6 \pm 2,0 ^a	0,8 \pm 1,2 ^b
18:4(n-3)	10,0 \pm 3,3 ^a	8,6 \pm 4,7 ^a	13,7 \pm 4,7 ^a	3,6 \pm 4,1 ^a
18:5(n-3)	1,4 \pm 0,5 ^a	1,2 \pm 0,6 ^a	1,7 \pm 0,4 ^a	0,5 \pm 0,7 ^b
20:4(n-6) AA	1,1 \pm 0,1 ^{bc}	1,2 \pm 0,4 ^b	0,4 \pm 0,2 ^c	2,3 \pm 1,0 ^a
20:5(n-3) EPA	13,1 \pm 2,6 ^a	11,1 \pm 2,3 ^a	12,3 \pm 3,2 ^a	14,4 \pm 2,9 ^a
22:5(n-6)	0,6 \pm 0,2 ^a	0,5 \pm 0,3 ^a	0,9 \pm 0,3 ^a	0,2 \pm 0,2 ^a
22:6(n-3) DHA	5,8 \pm 1,2 ^a	4,6 \pm 2,3 ^a	7,3 \pm 1,6 ^a	2,9 \pm 2,5 ^a
Σ SAFA	33,3 \pm 1,7 ^a	38,0 \pm 5,3 ^a	34,3 \pm 5,6 ^a	38,8 \pm 5,7 ^a
Σ MUFA	20,2 \pm 1,5 ^a	22,0 \pm 3,0 ^a	19,9 \pm 6,3 ^a	22,9 \pm 3,2 ^a
Σ n-9	6,3 \pm 1,6 ^a	7,8 \pm 5,7 ^a	11,4 \pm 7,9 ^a	3,7 \pm 2,0 ^a
Σ n-7	13,9 \pm 0,8 ^b	14,2 \pm 2,8 ^b	8,5 \pm 1,6 ^c	19,2 \pm 4,7 ^a
Σ PUFA	46,5 \pm 2,2 ^a	40,0 \pm 7,9 ^a	45,8 \pm 11,8 ^a	38,3 \pm 8,3 ^a
Σ n-4	4,9 \pm 2,7 ^a	4,7 \pm 2,4 ^a	0,9 \pm 0,2 ^b	7,0 \pm 0,7 ^a
Σ n-6	6,8 \pm 1,1 ^a	6,1 \pm 1,3 ^a	5,2 \pm 0,9 ^a	7,4 \pm 1,7 ^a
Σ n-3	34,6 \pm 4,2 ^a	28,8 \pm 9,4 ^a	40,5 \pm 11,1 ^a	22,4 \pm 10,3 ^a
n-3/n-6	5,1 \pm 0,0 ^a	4,7 \pm 0,0 ^a	7,8 \pm 0,0 ^a	3,0 \pm 0,0 ^a
22:6/20:5	0,4 \pm 0,0 ^a	0,4 \pm 0,0 ^a	0,6 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,0 ^b
22:5/20:4	0,6 \pm 0,0 ^b	0,4 \pm 0,0 ^b	2,2 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,0 ^c
20:5/20:4	11,5 \pm 0,0 ^b	9,1 \pm 0,0 ^b	32,2 \pm 0,0 ^a	6,2 \pm 0,0 ^b

18:4 (n-3), EPA y DHA, la suma de los cuales suponía el 79,6%, 80,2% y 84,2% del total de ácidos grasos de la dietas IPC, IP2C e IP, respectivamente. Por el contrario, los principales ácidos grasos encontrados en la dieta monoespecífica C fueron el 14:0, 16:1(n-7), EPA, 16:0 y 16:3(n-4), y la suma de todos ellos suponía el 73,1% del total de los ácidos grasos. Además, hay que destacar que en la dieta monoespecífica C, la cantidad de ácido linoleico (18:2 (n-6)) ($p < 0,05$) y ácido linolénico (18:3(n-3)) ($p < 0,05$), fue mucho más baja que en las otras dietas.

El contenido total de los ácidos grasos saturados (SAFAs), monoinsaturados (MUFAs) y poliinsaturados (PUFAs) en las dietas ensayadas no fue diferente significativamente de unas a otras ($p > 0,05$). Sin embargo, el porcentaje de SAFAs y MUFAs fue mayor en las dietas IP2C y C, que en las dietas IPC e IP. Por el contrario, los PUFAs en las dietas IP2C y C fueron menos abundantes que en las otras dietas. El ratio (n-3)/(n-6) más alto lo encontramos en la dieta IP, con un valor de 7,8, y el más bajo se observó en la dieta C con un valor de 3,0. De la misma manera, y siguiendo la misma tendencia, el ratio 22:6/20:5 más elevado se observó en la dieta IP, siendo tres veces superior al encontrado en la dieta C, y diferente significativamente con el resto de dietas ($p < 0,05$). Además, el ratio 20:5/20:4 más alto también se observó en la dieta IP y fue cinco veces mayor que el mismo ratio en la dieta C.

Composición bioquímica y de ácidos grasos de las larvas

Al comienzo de la prueba, en la composición bioquímica de la larva D veliger destacó el acúmulo de proteínas y lípidos totales (Fig. III. 5. B). El mayor contenido en proteínas se observó en las larvas alimentadas con la dieta C a los 22 días, mientras que el más bajo lo encontramos en las larvas alimentadas con la dieta IP ($p < 0,05$). Sin embargo, el mayor porcentaje de lípidos totales se observó en las larvas alimentadas con IP, el cual fue diferente significativamente al contenido en las larvas alimentadas con el resto de dietas (IPC, IP2C y C) ($p < 0,05$). Por último, no se encontraron diferencias en la proporción de carbohidratos entre las larvas alimentadas con diferentes dietas ($p > 0,05$).

Lípidos neutros

Las larvas D (día 2), en la fracción de lípidos neutros, almacenaron principalmente 16:0, 18:1(n-9), 16:1(n-7), 14:0 y EPA (Tabla III. 4). Sin embargo, la composición en lípidos neutros, de las larvas a los 22 días de cultivo, estaba claramente relacionada con la composición de la dieta con la cual se había estado alimentando a cada grupo de larvas. Así, al final del experimento, las larvas alimentadas con IPC e IP presentaron una mayor proporción de 18:1(n-9), 18:2(n-6), 18:3(n-3), 18:4(n-3) y DHA

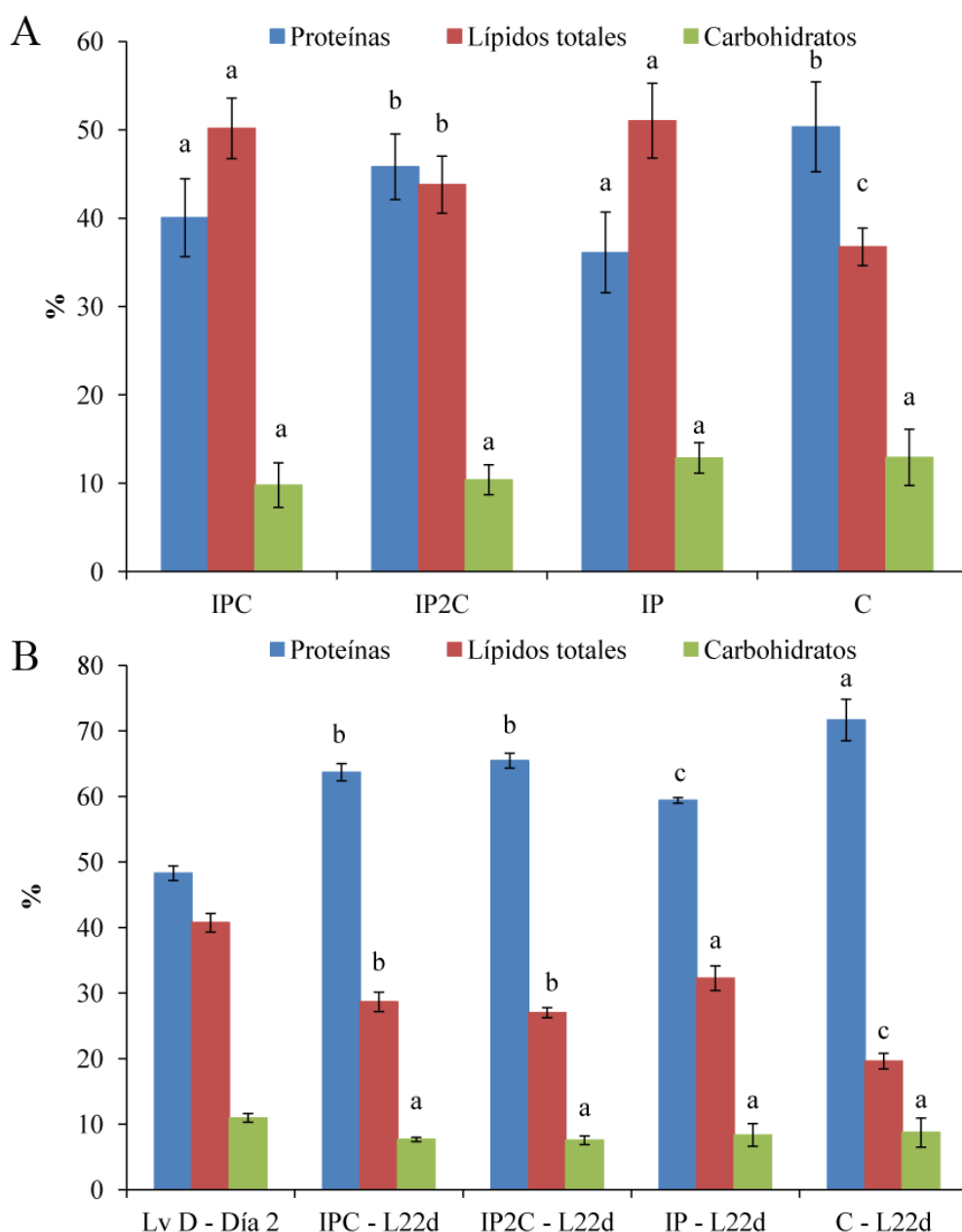


Figura III. 5. A.- Composición bioquímica en porcentaje de las dietas ensayadas (valores expresados como media \pm desviación estándar). B.- Composición bioquímica de las larvas de *R. decussatus* en porcentajes (valores expresados como media \pm desviación estándar) a día 2 (Lv D) y día 22 (L22d). C: dieta de *C. muelleri*; IP: dieta de *I. galbana* and *D. lutheri* (1:1); IPC: dieta de *I. galbana*, *D. lutheri* and *C. muelleri* (1:1:1); IP2C: dieta de *I. galbana*, *D. lutheri* and *C. muelleri* (1:1:2). Los valores para el mismo componente bioquímico con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

en los lípidos neutros que las larvas alimentadas con IP2C y C. Por el contrario, las larvas alimentadas con IP2C y C, a día 22, mostraron mayor contenido en 14:0, 16:1(n-7), 18:1(n-7) y 16:3(n-4) que los otros dos grupos. Además, las larvas alimentadas con la dieta C, a día 22, mostraron el mayor porcentaje de ARA ($p < 0,05$).

Las dietas IP e IPC, promovieron un mayor acúmulo de PUFAs, especialmente de la serie de los omega-3, en la fracción de lípidos neutros de las larvas. Sin embargo, las larvas alimentadas con las dietas con mayor proporción de diatomeas, IP2C y C, exhibieron mayor proporción de MUFAs y de ácidos grasos no-metilén-interrumpido (NMIDs) que el resto de grupos ensayados.

En relación a las proporciones de ácidos grasos en las larvas estudiadas, el ratio más alto en lípidos neutros de (n-3)/(n-6) fue de 5,5 en las larvas alimentadas con IP, mientras que el valor más bajo, 3,1, lo presentaban las larvas alimentadas con C. De la misma manera, la proporción más elevada de 22:6/20:5 ($p < 0,05$) y de 20:5/20:4 ($p < 0,05$) también la encontramos en las larvas alimentadas con IP, siendo diez y cinco veces superior, respectivamente, a las observadas en las larvas alimentadas con C.

Lípidos polares

Las larvas D (día 2), en la fracción de lípidos polares, almacenaron principalmente 16:0, DHA, EPA, 18:0 dma y 18:0 (Tabla III. 5). De la misma manera, al final del experimento, las larvas alimentadas con IP exhibieron mayor acúmulo de DHA, 16:0, EPA, 18:0dma y 18:0. Diferente a la dieta C, que promovió una mayor proporción de EPA, 18:0dma, 16:0, DHA y 22:2j en los lípidos polares de las larvas que la consumieron.

La composición de ácidos grasos en los lípidos polares de las larvas al final de la prueba, reflejó el perfil de ácidos grasos de las dietas. Por ejemplo, los altos niveles de DHA y 18:4(n-3) detectados en la dieta IP, se observaron también en los lípidos polares de las larvas alimentadas con tal dieta. Del mismo modo, las larvas alimentadas con la dieta C presentaban la misma riqueza en EPA y 16:1(n-7) que se observó en su dieta. Incluso, las proporciones de ácidos grasos de las larvas alimentadas con las dietas IPC e IP2C, reflejaban la cantidad relativa de *C. muelleri* que contenía cada dieta.

Las únicas larvas de 22 días que, en sus lípidos polares contenían mayor cantidad de EPA que de DHA, fueron aquellas alimentadas con la dieta monoespecífica de *C. muelleri*. Además, esta dieta conllevó un gran enriquecimiento en 22:5(n-3) en los lípidos polares, comparado con las larvas de las otras dietas.

Tabla III. 4.- Composición de ácidos grasos en porcentajes del contenido de lípidos neutros de larvas de *R. decussatus* (valores expresados como media \pm desviación estándar) a día 2 (Lv D) y día 22 (L22d). C: dieta de *C. muelleri*; IP: dieta de *I. galbana* y *D. lutheri* (1:1); IPC: dieta de *I. galbana*, *D. lutheri* y *C. muelleri* (1:1:1); IP2C: dieta de *I. galbana*, *D. lutheri* y *C. muelleri* (1:1:2). Los valores de la misma fila con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

	Lv D - Día 2	IPC - L22d	IP2C - L22d	IP - L22d	C - L22d
14:0	8,3 \pm 0,0 ^d	13,9 \pm 0,5 ^{bc}	16,6 \pm 0,3 ^{ab}	12,7 \pm 0,0 ^c	17,6 \pm 1,6 ^a
16:0	25,9 \pm 0,0 ^a	11,9 \pm 0,1 ^b	12,3 \pm 0,3 ^b	15,0 \pm 0,6 ^b	10,8 \pm 1,2 ^b
18:0	5,0 \pm 0,0 ^a	3,0 \pm 0,0 ^a	3,7 \pm 0,2 ^a	3,4 \pm 0,1 ^a	3,2 \pm 2,1 ^a
16:1(n-9)	0,7 \pm 0,0 ^a	0,4 \pm 0,0 ^c	0,4 \pm 0,0 ^{bc}	0,6 \pm 0,0 ^b	0,5 \pm 0,1 ^{bc}
16:1(n-7)	12,0 \pm 0,0 ^{ab}	9,0 \pm 0,2 ^{bd}	10,5 \pm 0,0 ^{bc}	7,3 \pm 0,2 ^d	13,9 \pm 1,0 ^a
16:1(n-13)t	0,0 \pm 0,0 ^d	0,4 \pm 0,0 ^c	0,6 \pm 0,0 ^b	0,3 \pm 0,0 ^c	0,8 \pm 0,1 ^a
18:1(n-9)	16,3 \pm 0,0 ^a	4,7 \pm 0,2 ^b	4,5 \pm 0,2 ^b	6,2 \pm 0,3 ^b	2,7 \pm 0,5 ^b
18:1(n-7)	5,5 \pm 0,0 ^b	5,3 \pm 0,0 ^b	6,8 \pm 0,2 ^a	5,0 \pm 0,2 ^b	8,2 \pm 0,5 ^a
20:1(n-11)	1,3 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,0 ^b	0,2 \pm 0,0 ^b	0,2 \pm 0,0 ^b	0,2 \pm 0,1 ^b
20:1(n-9)	0,9 \pm 0,0 ^a	0,5 \pm 0,0 ^c	0,5 \pm 0,0 ^c	0,7 \pm 0,0 ^b	0,3 \pm 0,1 ^d
20:1(n-7)	0,6 \pm 0,0 ^a	0,4 \pm 0,0 ^b	0,3 \pm 0,3 ^b	0,3 \pm 0,0 ^b	0,6 \pm 0,0 ^a
16:2(n-7)	0,0 \pm 0,0 ^c	0,2 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,0 ^b	0,2 \pm 0,0 ^a
16:2(n-4)	0,0 \pm 0,0 ^d	0,9 \pm 0,0 ^b	1,0 \pm 0,0 ^b	0,5 \pm 0,0 ^c	1,5 \pm 0,1 ^a
16:3(n-6)	0,5 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,0 ^c	0,1 \pm 0,0 ^b	0,1 \pm 0,0 ^d	0,1 \pm 0,0 ^b
16:3(n-4)	0,0 \pm 0,0 ^c	1,1 \pm 0,0 ^b	1,6 \pm 0,1 ^b	0,0 \pm 0,0 ^c	3,4 \pm 0,2 ^a
16:3(n-3)	0,7 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^b	0,0 \pm 0,0 ^b	0,0 \pm 0,0 ^b	0,1 \pm 0,2 ^b
16:4(n-3)	0,0 \pm 0,0 ^a	0,3 \pm 0,2 ^a	0,1 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,2 ^a
18:2(n-6)	5,1 \pm 0,0 ^a	2,3 \pm 0,0 ^c	2,3 \pm 0,1 ^c	3,0 \pm 0,1 ^b	1,3 \pm 0,0 ^d
18:2(n-4)	0,0 \pm 0,0 ^a	0,3 \pm 0,0 ^a	0,3 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,0 ^a	0,4 \pm 0,3 ^a
18:3(n-6)	0,3 \pm 0,0 ^a	0,8 \pm 0,0 ^a	0,8 \pm 0,0 ^a	0,5 \pm 0,0 ^a	0,7 \pm 0,4 ^a
18:3(n-3)	0,0 \pm 0,0 ^d	2,9 \pm 0,0 ^b	2,1 \pm 0,0 ^c	4,2 \pm 0,2 ^a	0,0 \pm 0,0 ^d
18:4(n-3)	1,3 \pm 0,0 ^d	7,9 \pm 0,1 ^b	5,4 \pm 0,3 ^c	10,6 \pm 0,9 ^a	0,7 \pm 0,1 ^d
20:2i	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^b	0,0 \pm 0,0 ^c	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^d
20:2j	0,2 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,0 ^b	0,1 \pm 0,0 ^c	0,1 \pm 0,0 ^b	0,2 \pm 0,0 ^a
20:2(n-6)	1,1 \pm 0,0 ^a	1,1 \pm 0,2 ^a	0,8 \pm 0,0 ^{ab}	1,0 \pm 0,0 ^{ab}	0,6 \pm 0,3 ^b
20:3(n-6)	0,1 \pm 0,0 ^c	0,3 \pm 0,0 ^b	0,3 \pm 0,0 ^b	0,2 \pm 0,0 ^c	0,4 \pm 0,0 ^a
20:4(n-6) AA	0,7 \pm 0,0 ^c	1,7 \pm 0,0 ^b	2,3 \pm 0,0 ^b	0,7 \pm 0,0 ^c	4,6 \pm 0,1 ^a
20:4(n-3)	0,3 \pm 0,0 ^c	0,4 \pm 0,0 ^b	0,3 \pm 0,0 ^d	0,5 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,0 ^c
20:5(n-3) EPA	5,7 \pm 0,0 ^c	19,0 \pm 0,1 ^{ab}	16,8 \pm 0,6 ^{ab}	13,6 \pm 0,3 ^b	21,9 \pm 0,9 ^a
21:4(n-6)	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,4 \pm 0,0 ^b
21:5(n-3)	0,6 \pm 0,0 ^a	0,5 \pm 0,0 ^a	0,5 \pm 0,0 ^a	0,5 \pm 0,0 ^a	0,7 \pm 0,0 ^a
22:2i	0,6 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,0 ^a	0,3 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,2 ^a
22:2j	1,5 \pm 0,1 ^a	0,4 \pm 0,1 ^d	0,7 \pm 0,0 ^c	0,3 \pm 0,1 ^d	1,0 \pm 0,1 ^b
22:4(n-6)	0,3 \pm 0,0 ^a	0,3 \pm 0,2 ^a	0,1 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,3 ^a
22:5(n-6)	0,0 \pm 0,0 ^d	1,4 \pm 0,0 ^b	1,0 \pm 0,0 ^c	1,9 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^d
22:5(n-3)	0,8 \pm 0,0 ^a	0,4 \pm 0,0 ^b	0,0 \pm 0,0 ^c	0,3 \pm 0,0 ^b	0,4 \pm 0,0 ^b
22:6(n-3) DHA	3,4 \pm 0,0 ^d	7,5 \pm 0,1 ^b	5,9 \pm 0,1 ^c	9,5 \pm 0,1 ^a	1,5 \pm 0,2 ^c
18:0dma	0,3 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,0 ^b	0,2 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,0 ^b	0,2 \pm 0,0 ^a
Σ SAFA	39,2 \pm 0,1 ^a	29,0 \pm 0,4 ^b	32,7 \pm 0,9 ^b	31,2 \pm 0,9 ^b	31,8 \pm 1,1 ^b
Σ DMA	0,3 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,0 ^b	0,2 \pm 0,0 ^{ab}	0,2 \pm 0,0 ^b	0,2 \pm 0,0 ^{ab}
Σ MUFA	37,4 \pm 0,0 ^a	21,0 \pm 0,0 ^d	23,9 \pm 0,5 ^c	20,5 \pm 0,4 ^d	27,2 \pm 1,4 ^b
Σ n-9	17,9 \pm 0,0 ^a	5,7 \pm 0,2 ^b	5,5 \pm 0,1 ^b	7,4 \pm 0,4 ^b	3,5 \pm 0,5 ^b
Σ n-7	18,2 \pm 0,0 ^b	14,7 \pm 0,2 ^{bc}	17,6 \pm 0,5 ^b	12,6 \pm 0,0 ^c	22,7 \pm 1,5 ^a
Σ PUFA	21,1 \pm 0,0 ^c	49,4 \pm 0,5 ^a	42,3 \pm 1,4 ^{ab}	47,6 \pm 1,4 ^a	39,6 \pm 1,3 ^b
Σ n-4	0,0 \pm 0,0 ^a	2,3 \pm 0,1 ^a	3,0 \pm 0,2 ^a	0,8 \pm 0,0 ^a	1,2 \pm 2,5 ^a
Σ n-6	8,2 \pm 0,0 ^a	8,1 \pm 0,5 ^a	7,8 \pm 0,2 ^a	7,1 \pm 0,0 ^a	8,3 \pm 0,9 ^a
Σ n-3	12,9 \pm 0,0 ^a	40,2 \pm 0,0 ^b	32,3 \pm 1,0 ^c	41,2 \pm 1,4 ^b	25,7 \pm 1,0 ^d
Σ NMID	2,3 \pm 0,1 ^a	0,6 \pm 0,1 ^b	1,1 \pm 0,0 ^{bc}	0,7 \pm 0,2 ^b	1,4 \pm 0,3 ^c
n-3/n-6	1,6 \pm 0,0 ^d	5,0 \pm 0,3 ^a	4,1 \pm 0,0 ^b	5,5 \pm 0,2 ^a	3,1 \pm 0,4 ^c
22:6/20:5	0,6 \pm 0,0 ^b	0,4 \pm 0,0 ^c	0,3 \pm 0,0 ^d	0,7 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,0 ^c
22:5/20:4	0,0 \pm 0,0 ^d	0,8 \pm 0,0 ^b	0,5 \pm 0,0 ^c	2,9 \pm 0,1 ^a	0,0 \pm 0,0 ^d
20:5/20:4	8,0 \pm 0,0 ^c	10,8 \pm 0,1 ^b	7,3 \pm 0,2 ^c	20,4 \pm 1,3 ^a	4,8 \pm 0,1 ^d

Tabla III. 5.- Composición de ácidos grasos en porcentajes del contenido de lípidos polares de larvas de *R. decussatus* (valores expresados como media \pm desviación estándar) a día 2 (Lv D) y día 22 (L22d). C: dieta de *C. muelleri*; IP: dieta de *I. galbana* y *D. lutheri* (1:1); IPC: dieta de *I. galbana*, *D. lutheri* y *C. muelleri* (1:1:1); IP2C: dieta de *I. galbana*, *D. lutheri* y *C. muelleri* (1:1:2). Los valores de la misma fila con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

	Lv D - Día 2	IPC - L22d	IP2C - L22d	IP - L22d	C - L22d
14:0	1,4 \pm 0,0 ^e	2,2 \pm 0,0 ^a	2,2 \pm 0,1 ^a	2,4 \pm 0,1 ^a	2,0 \pm 0,2 ^b
16:0	17,8 \pm 1,0 ^e	16,8 \pm 0,1 ^b	16,1 \pm 0,1 ^b	19,7 \pm 0,4 ^a	13,5 \pm 0,4 ^d
18:0	6,0 \pm 0,5 ^d	6,7 \pm 0,3 ^c	7,2 \pm 0,2 ^b	6,6 \pm 0,1 ^c	9,0 \pm 0,1 ^a
20:0	1,2 \pm 0,1 ^a	0,8 \pm 0,0 ^c	0,7 \pm 0,0 ^c	1,0 \pm 0,0 ^b	0,0 \pm 0,0 ^d
22:0	2,2 \pm 1,6 ^a	1,0 \pm 0,5 ^b	0,4 \pm 0,0 ^b	0,5 \pm 0,2 ^b	0,2 \pm 0,1 ^b
16:1(n-9)	1,7 \pm 0,0 ^a	0,6 \pm 0,1 ^d	0,8 \pm 0,2 ^c	0,3 \pm 0,0 ^c	1,3 \pm 0,1 ^b
16:1(n-7)	3,2 \pm 0,0 ^a	1,5 \pm 0,0 ^d	1,7 \pm 0,0 ^c	1,4 \pm 0,1 ^c	2,8 \pm 0,1 ^b
16:1(n-13)t	1,0 \pm 0,1 ^a	0,2 \pm 0,0 ^d	0,3 \pm 0,0 ^c	0,2 \pm 0,0 ^d	0,4 \pm 0,0 ^b
18:1(n-11)	0,0 \pm 0,0 ^c	0,1 \pm 0,1 ^b	0,0 \pm 0,0 ^b	0,2 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^c
18:1(n-9)	2,4 \pm 0,1 ^b	2,4 \pm 0,1 ^b	2,4 \pm 0,1 ^b	2,7 \pm 0,1 ^a	2,6 \pm 0,3 ^{ab}
18:1(n-7)	2,4 \pm 0,1 ^d	2,7 \pm 0,1 ^c	3,2 \pm 0,1 ^b	3,1 \pm 0,2 ^b	3,4 \pm 0,1 ^a
20:1(n-11)	2,1 \pm 0,0 ^a	2,1 \pm 0,1 ^a	2,4 \pm 0,1 ^b	1,9 \pm 0,1 ^c	2,6 \pm 0,1 ^d
20:1(n-9)	1,4 \pm 0,0 ^a	1,2 \pm 0,1 ^b	1,1 \pm 0,1 ^c	1,4 \pm 0,1 ^a	0,8 \pm 0,0 ^d
20:1(n-7)	1,3 \pm 0,0 ^b	1,0 \pm 0,0 ^d	1,2 \pm 0,0 ^c	0,9 \pm 0,0 ^c	1,5 \pm 0,0 ^a
16:3(n-6)	0,4 \pm 0,3 ^a	0,4 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,2 ^{ab}	0,0 \pm 0,0 ^b	0,2 \pm 0,2 ^{ab}
18:2(n-6)	0,5 \pm 0,0 ^{ab}	0,4 \pm 0,0 ^b	0,5 \pm 0,0 ^{ab}	0,5 \pm 0,1 ^{ab}	0,5 \pm 0,1 ^a
18:2(n-4)	0,0 \pm 0,0 ^c	0,2 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,0 ^{ab}	0,2 \pm 0,0 ^b	0,2 \pm 0,0 ^a
18:3(n-6)	0,9 \pm 0,4 ^a	0,3 \pm 0,1 ^b	0,1 \pm 0,0 ^b	0,2 \pm 0,1 ^b	0,1 \pm 0,0 ^b
18:3(n-3)	1,0 \pm 0,8 ^c	1,7 \pm 0,5 ^b	1,4 \pm 0,3 ^{bc}	2,9 \pm 0,1 ^a	0,8 \pm 0,3 ^c
18:4(n-3)	0,8 \pm 0,0 ^d	1,0 \pm 0,0 ^b	0,9 \pm 0,0 ^c	1,4 \pm 0,1 ^a	0,0 \pm 0,0 ^c
20:2i	0,1 \pm 0,0 ^b	0,1 \pm 0,0 ^b	0,1 \pm 0,0 ^b	0,1 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,0 ^c
20:2j	0,1 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^d	0,1 \pm 0,0 ^c	0,1 \pm 0,0 ^c	0,1 \pm 0,0 ^b
20:2(n-6)	2,3 \pm 0,6 ^a	2,3 \pm 0,2 ^a	1,8 \pm 0,0 ^b	2,1 \pm 0,1 ^{ab}	1,0 \pm 0,0 ^c
20:3(n-6)	0,1 \pm 0,0 ^d	0,2 \pm 0,0 ^c	0,2 \pm 0,0 ^b	0,1 \pm 0,0 ^d	0,4 \pm 0,0 ^a
20:4(n-6) AA	2,5 \pm 0,0 ^d	2,8 \pm 0,2 ^c	3,3 \pm 0,1 ^b	1,7 \pm 0,0 ^c	5,6 \pm 0,1 ^a
20:4(n-3)	0,3 \pm 0,0 ^b	0,3 \pm 0,0 ^b	0,2 \pm 0,0 ^c	0,4 \pm 0,0 ^a	0,1 \pm 0,0 ^d
20:5(n-3) EPA	14,0 \pm 0,0 ^b	10,3 \pm 0,4 ^d	11,2 \pm 0,3 ^c	8,5 \pm 0,3 ^c	17,1 \pm 0,5 ^a
21:4(n-6)	0,5 \pm 0,0 ^d	0,6 \pm 0,1 ^c	0,7 \pm 0,0 ^b	0,0 \pm 0,0 ^c	2,6 \pm 0,1 ^a
21:5(n-3)	1,7 \pm 0,2 ^c	2,6 \pm 0,3 ^b	2,5 \pm 0,0 ^b	2,3 \pm 0,1 ^b	3,2 \pm 0,1 ^a
22:2i	1,7 \pm 0,0 ^d	3,1 \pm 0,3 ^b	3,1 \pm 0,1 ^b	3,4 \pm 0,2 ^a	2,2 \pm 0,1 ^c
22:2j	3,8 \pm 0,0 ^d	5,0 \pm 0,3 ^c	6,2 \pm 0,1 ^b	3,9 \pm 0,2 ^d	8,4 \pm 0,2 ^a
22:4(n-6)	2,7 \pm 0,1 ^a	2,0 \pm 0,4 ^b	1,3 \pm 0,1 ^c	0,4 \pm 0,1 ^d	2,8 \pm 0,1 ^a
22:4(n-9)t	0,0 \pm 0,0 ^b	1,1 \pm 1,0 ^a	0,7 \pm 0,1 ^{ab}	1,0 \pm 0,6 ^a	0,4 \pm 0,1 ^b
22:5(n-6)	2,2 \pm 0,0 ^c	5,4 \pm 1,2 ^{ab}	4,7 \pm 0,1 ^b	5,7 \pm 0,4 ^a	1,6 \pm 0,2 ^c
22:5(n-3)	3,4 \pm 0,0 ^b	1,8 \pm 0,1 ^d	2,2 \pm 0,1 ^c	1,4 \pm 0,0 ^c	3,7 \pm 0,1 ^a
22:6(n-3) DHA	16,7 \pm 0,1 ^c	18,7 \pm 1,0 ^b	18,7 \pm 0,3 ^b	21,3 \pm 0,6 ^a	8,7 \pm 0,3 ^d
18:0dma	8,4 \pm 0,1 ^c	10,2 \pm 2,1 ^{bc}	11,4 \pm 2,2 ^b	4,5 \pm 0,3 ^d	15,2 \pm 1,0 ^a
Σ SFA	28,6 \pm 0,0 ^b	27,6 \pm 0,2 ^c	26,7 \pm 0,3 ^d	30,2 \pm 0,2 ^a	24,7 \pm 0,7 ^c
Σ DMA	8,4 \pm 0,1 ^c	10,4 \pm 2,2 ^b	11,7 \pm 2,2 ^b	4,7 \pm 0,3 ^d	15,4 \pm 1,0 ^a
Σ MUFA	15,5 \pm 0,2 ^a	11,9 \pm 0,5 ^c	13,2 \pm 0,1 ^b	12,1 \pm 0,3 ^c	15,3 \pm 0,4 ^a
Σ n-9	5,5 \pm 0,1 ^a	4,2 \pm 0,2 ^c	4,3 \pm 0,0 ^c	4,5 \pm 0,1 ^{bc}	4,7 \pm 0,3 ^b
Σ n-7	6,9 \pm 0,1 ^b	5,3 \pm 0,2 ^d	6,1 \pm 0,0 ^c	5,3 \pm 0,3 ^d	7,6 \pm 0,1 ^a
Σ PUFA	50,1 \pm 0,3 ^b	52,2 \pm 1,1 ^a	50,6 \pm 0,5 ^b	50,2 \pm 0,2 ^b	49,3 \pm 0,5 ^c
Σ n-4	0,0 \pm 0,0 ^c	0,2 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,0 ^{ab}	0,2 \pm 0,0 ^{ab}	0,1 \pm 0,1 ^b
Σ n-6	12,2 \pm 0,8 ^b	14,4 \pm 1,4 ^a	12,8 \pm 0,2 ^b	10,8 \pm 0,6 ^c	15,0 \pm 0,3 ^a
Σ n-3	40,2 \pm 0,5 ^c	43,0 \pm 1,0 ^b	42,4 \pm 0,4 ^b	45,0 \pm 0,4 ^a	35,7 \pm 0,5 ^d
Σ NMID	5,7 \pm 0,1 ^c	8,3 \pm 0,6 ^c	9,4 \pm 0,1 ^b	7,4 \pm 0,4 ^d	10,7 \pm 0,2 ^a
n-3/n-6	3,3 \pm 0,3 ^b	3,0 \pm 0,2 ^c	3,3 \pm 0,1 ^b	4,2 \pm 0,2 ^a	2,4 \pm 0,1 ^d
22:6/20:5	1,2 \pm 0,0 ^d	1,8 \pm 0,1 ^b	1,7 \pm 0,0 ^c	2,5 \pm 0,0 ^a	0,5 \pm 0,0 ^c
22:5/20:4	0,9 \pm 0,0 ^d	2,0 \pm 0,6 ^b	1,4 \pm 0,0 ^c	3,4 \pm 0,3 ^a	0,3 \pm 0,0 ^c
20:5/20:4	5,7 \pm 0,1 ^a	3,7 \pm 0,3 ^c	3,3 \pm 0,2 ^d	5,0 \pm 0,2 ^b	3,0 \pm 0,0 ^c

A pesar de que no se registraron diferencias significativas en las proporciones del total de SAFAs, de MUFAs y de PUFAs de las dietas (Tabla III. 3), sus porcentajes en los lípidos polares de las larvas fueron diferentes ($p < 0,05$) (Tabla III. 5). Los mayores niveles de SAFAs ($p < 0,05$) y PUFAs ($p < 0,05$), en lípidos polares, se observaron en las larvas alimentadas con IP e IPC, respectivamente, mientras que las proporciones más altas de MUFAs ($p < 0,05$) y NMIDs ($p < 0,05$) se encontraron en las larvas alimentadas con la dieta C. Sin embargo, en todos los grupos de larvas, la proporción de NMIDs en lípidos polares fue mayor que en lípidos neutros. Los ratios n-3/n-6 ($p < 0,05$), 22:6/20:5 ($p < 0,05$) y 20:5/20:4 ($p < 0,05$) de los lípidos polares de las larvas a los 22 días de cultivo, fueron mayores en aquellas alimentadas con la dieta IP, que en las que se alimentaron con el resto de dietas, es decir con las dietas que contenían la especie *C. muelleri*.

Variaciones de los AG a lo largo del cultivo larvario en los lípidos neutros y polares

La dieta mixta IPC ocasionó mayor acúmulo de 18:2(n-6) ($p < 0,05$) y de 18:4(n-3) ($p < 0,05$) en la fracción de los lípidos neutros de las larvas (ng AG $\mu\text{g muestra}^{-1}$) comparada con el resto de dietas (Fig. III. 6. A y C). Las larvas alimentadas con la dieta IPC también fueron las que más cantidad de EPA por μg de muestra, almacenaron en los lípidos neutros ($p < 0,05$) (Fig. III. 6. C), mientras que las larvas alimentadas con la dieta C, a día 22, retuvieron más EPA en los lípidos polares que el resto de grupos ($p < 0,05$) (Fig. III. 6. D). La mayor cantidad de ARA se observó en las larvas alimentadas con la dieta C, tanto en los lípidos neutros ($p < 0,05$) como en los polares ($p < 0,05$) (Fig. III. 6. A y B). Sin embargo, estas larvas mostraron la acumulación más baja de DHA en ambas fracciones; LN ($p < 0,05$) y LP ($p < 0,05$), comparadas con el resto de larvas que se alimentaron con las otras dietas ensayadas (Fig. III. 6. E y F).

Los ácidos grasos de la fracción polar que más aumentaron a lo largo del cultivo, fueron el DHA, 16:0, EPA, 18:0dms y el 18:0 en todas aquellas larvas que habían sido alimentadas con las dietas que contenían las especies *I. galbana* y *D. lutheri* (Tabla III. 6). Especialmente, el DHA fue el ácido graso que representó el mayor incremento, en proporción, en las larvas alimentadas con las dietas IPC, IP2C e IP, mientras que en las larvas alimentadas con la dieta C, el ácido graso que más aumentó fue el EPA. Además

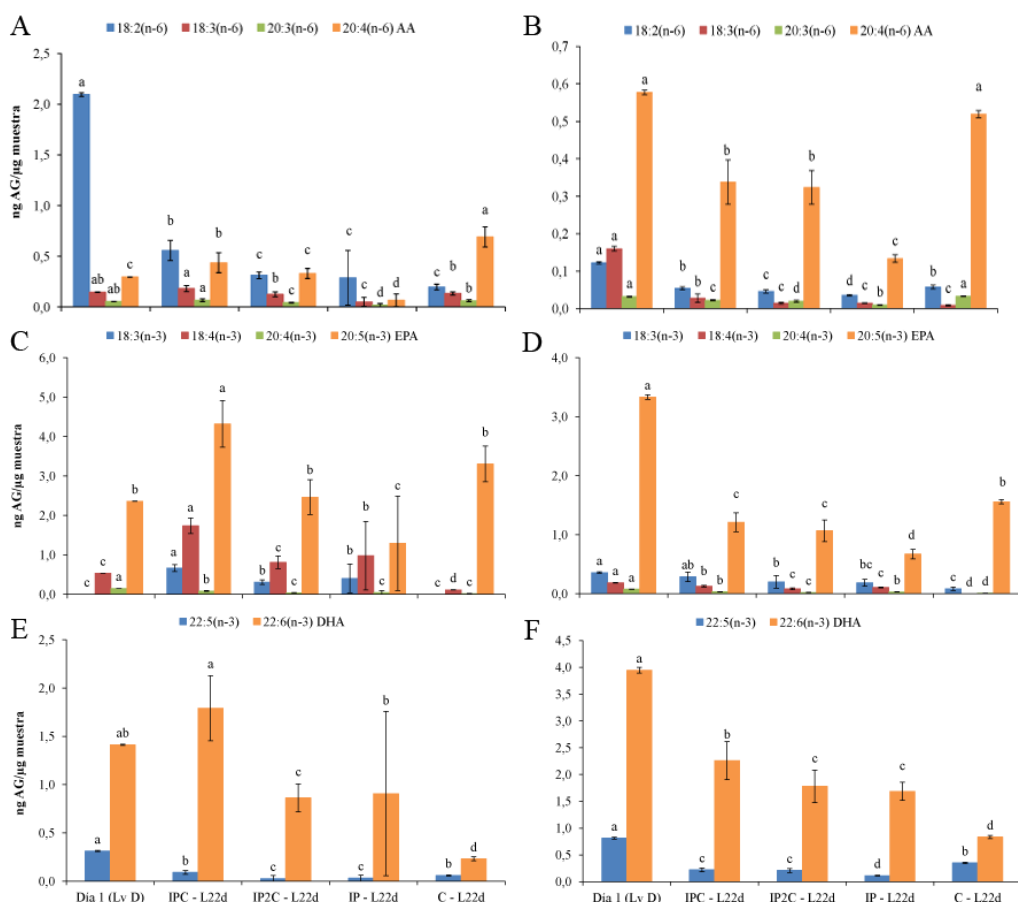


Figura III. 6.- Contenido en ng AG $\mu\text{g muestra}^{-1}$ de ARA (A), EPA (C) y DHA (E), y sus precursores en los lípidos neutros, y de ARA (B), EPA (D) y DHA (F), y sus precursores en lípidos polares de larvas de *R. decussatus* (valores expresados como media \pm desviación estándar) a día 2 (Lv D) y día 22 (L22d). C: dieta de *C. muelleri*; IP: dieta de *I. galbana* y *D. lutheri* (1:1); IPC: dieta de *I. galbana*, *D. lutheri* y *C. muelleri* (1:1:1); IP2C: dieta de *I. galbana*, *D. lutheri* y *C. muelleri* (1:1:2). Los valores para el mismo componente bioquímico con diferente letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

de éste, las larvas alimentadas con la dieta C retuvieron preferentemente, en los LP, 18:0dma, 16:0, 18:0 y 22:2NMI. Destaca que todos los ácidos grasos de la fracción de los lípidos polares de las larvas alimentadas con las dietas IPC e IP2C incrementaron desde la larva D hasta la larva premetamórfica. Al contrario de lo que ocurrió con el 20:0 y el 18:4(n-3) en las larvas alimentadas con la dieta C, que decrecieron con respecto a la larva D.

Tabla III. 6.- Variaciones de los ácidos grasos en lípidos neutros y polares de las larvas a los 22 días de cultivo (larva premetamórfica) con respecto a las larvas a los dos días (larva D). Valores expresados en porcentaje del total de ganancias o pérdidas. Las variaciones se calcularon en base a los valores medios. Los ácidos grasos cuya variación representó menos del 1% del total no aparecen en la lista. C: dieta de *C. muelleri*; IP: dieta de *I. galbana* y *D. lutheri* (1:1); IPC: dieta de *I. galbana*, *D. lutheri* y *C. muelleri* (1:1:1); IP2C: dieta de *I. galbana*, *D. lutheri* y *C. muelleri* (1:1:2).

	Lípidos neutros				Lípidos polares			
	IPC	IP2C	IP	C	IPC	IP2C	IP	C
14:0	14,2	16,5	12,9	19,2	2,4	2,4	2,4	1,9
16:0	10,0	9,7	13,7	9,2	17,3	16,4	19,0	12,6
18:0	2,7	3,3	3,1	2,2	7,3	7,7	6,3	9,3
16:1(n-7)	8,7	9,7	6,9	14,4	1,4	1,6	1,0	2,9
18:1(n-9)	3,7	2,0	5,2	1,2	2,5	2,5	2,6	2,8
18:1(n-7)	5,6	6,8	4,8	8,7	2,9	3,3	2,9	3,6
20:1(n-11)	0,1	0,0	0,1	0,1	2,1	2,5	1,9	2,6
20:1(n-9)	0,5	0,5	0,6	0,2	1,3	1,1	1,4	0,7
20:1(n-7)	0,4	0,5	0,3	0,6	1,0	1,2	0,8	1,5
16:2(n-4)	0,9	1,1	0,6	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0
16:3(n-4)	1,2	1,9	0,0	3,9	0,0	0,0	0,0	0,0
18:2(n-6)	2,2	1,7	2,9	0,9	0,4	0,5	0,5	0,6
18:3(n-6)	0,8	1,0	0,6	0,5	0,2	0,1	0,1	0,0
18:3(n-3)	3,2	2,6	4,7	0,0	2,4	2,2	2,6	0,8
18:4(n-3)	8,2	6,5	11,9	0,7	1,1	0,9	1,5	-0,1
20:2(n-6)	1,1	1,2	1,0	0,5	2,3	1,9	2,1	0,9
20:4(n-6) AA	2,0	2,6	0,7	5,1	2,7	3,3	1,6	6,0
20:5(n-3) EPA	20,2	19,6	14,5	23,9	9,3	10,3	7,7	17,0
21:4(n-6)	0,1	0,0	0,0	0,4	0,5	0,8	-0,1	2,9
21:5(n-3)	0,5	0,5	0,5	0,7	2,5	2,5	2,4	3,4
22:2 NMI	0,5	0,7	0,4	1,1	8,2	9,4	7,9	11,2
22:4(n-6)	0,2	0,4	0,1	0,1	1,6	1,2	0,1	3,0
22:4(n-9)t	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	0,7	1,9	0,5
22:5(n-6)	1,6	1,3	2,1	0,0	5,8	4,7	7,1	1,7
22:5(n-3)	0,4	0,1	0,3	0,4	1,6	1,9	1,1	3,8
22:6(n-3) DHA	8,3	6,6	10,1	1,3	18,2	17,9	22,5	7,9
18:0dma	0,1	0,2	0,2	0,2	7,5	8,9	6,6	15,9
Σ SAFAs	27,2	30,0	29,8	30,7	28,5	27,6	29,1	23,7
Σ DMAs	0,1	0,2	0,2	0,2	7,7	9,1	6,9	16,2
Σ MUFAs	19,8	20,5	18,7	26,5	11,8	13,1	11,0	15,7
Σ n-9	4,6	2,8	6,4	1,9	4,2	4,2	4,1	4,8
Σ n-7	14,7	16,9	12,0	23,7	5,3	6,1	4,7	7,9
Σ PUFAAs	52,4	48,7	51,0	41,5	51,3	49,8	51,8	49,3
Σ n-4	2,5	3,4	0,9	1,0	0,3	0,2	0,2	0,2
Σ n-6	8,4	8,6	7,5	8,1	14,3	12,9	11,4	15,6
Σ n-3	42,9	37,7	44,6	27,3	42,5	41,3	47,2	35,2
Σ NMIDs	0,6	0,9	0,5	1,2	8,3	9,5	8,1	11,3

Relación entre el crecimiento, la supervivencia y la composición bioquímica y de ácidos grasos

El análisis de correlaciones, entre la talla (µm) o la supervivencia (%) de las larvas de *R. decussatus* a día 22 y la composición bioquímica y de ácidos grasos de las

Tabla III. 7.- Matriz con los coeficientes de las correlaciones de Pearson entre el tamaño de la concha y/o la supervivencia de las larvas pediveliger, a los 22 días de cultivo, y la composición bioquímica y de ácidos grasos. Los valores para las correlaciones con la composición bioquímica de las algas se calcularon a partir de muestras en $\mu\text{g mg muestra}^{-1}$, mientras que los de las larvas se calcularon en base a los ng larva^{-1} . Los valores para las correlaciones con la composición en ácidos grasos de las dietas, se calcularon en base a los porcentajes, con respecto del total, de cada uno de ellos, mientras que para las correlaciones con las larvas, se calcularon en base a los ng individuo^{-1} .

Variables independientes		Variables dependientes	
		Crecimiento ^a (n=8)	Supervivencia ^b (n = 8)
Dieta	Proteínas	-0,572	-0,009
	Lípidos	-0,746	-0,528
	Carbohidratos	-0,954	-0,863
	16:0	-0,953	-0,634
	18:0	0,022	0,003
	ARA	0,879	0,567
	EPA	0,540	-0,078
	DHA	-0,830	-0,654
	DPA	-0,849	-0,654
	SAFAs	0,430	0,406
	MUFAs	0,639	0,544
	PUFAs	-0,503	-0,457
	Proteínas	0,381	0,544
	Lípidos	-0,673	-0,073
Larvas	Carbohidratos	-0,106	0,147
LN de larvas	16:0	-0,515	-0,585
	18:0	-0,070	-0,399
	ARA	0,949	0,570
	EPA	0,373	0,172
	DHA	-0,498	-0,312
	DPA	-0,586	-0,318
	18:0dma	-0,099	-0,441
	22:2NMID	0,332	0,327
	SAFAs	-0,237	-0,339
	MUFAs	-0,055	-0,077
	PUFAs	-0,108	-0,133
LP de larvas	16:0	0,210	0,380
	18:0	0,912	0,710
	ARA	0,930	0,589
	EPA	0,951	0,570
	DHA	-0,256	0,140
	DPA	-0,213	-0,149
	18:0dma	0,619	0,480
	22:2NMID	0,911	0,775
	SAFAs	0,442	0,515
	MUFAs	0,939	0,741
	PUFAs	0,523	0,467

Las probabilidades significativas se muestran en negrita ($p < 0,05$).

a Medida media de la altura y longitud de 100 larvas.

b Supervivencia en porcentaje basada en el número inicial de larvas D de dos días.

dietas ($\mu\text{g mg muestra}^{-1}$) y las larvas (ng individuo^{-1}), reveló varias correlaciones, tanto positivas como negativas (Tabla III. 7). Existía una relación negativa entre la longitud de las larvas y el contenido en lípidos y carbohidratos de la dieta, de igual manera, que existía una correlación, también negativa, entre la supervivencia y la cantidad de carbohidratos de la dieta (Fig. III. 7. A y B). También se observó una correlación negativa significativa entre los ácidos grasos de la dieta, 16:0, DHA y DPA, y la talla de las larvas (Fig. III. 7. C y D). Sin embargo, el ARA que contenía la dieta estaba relacionado positivamente con el tamaño de la concha (Fig. III. 7. A).

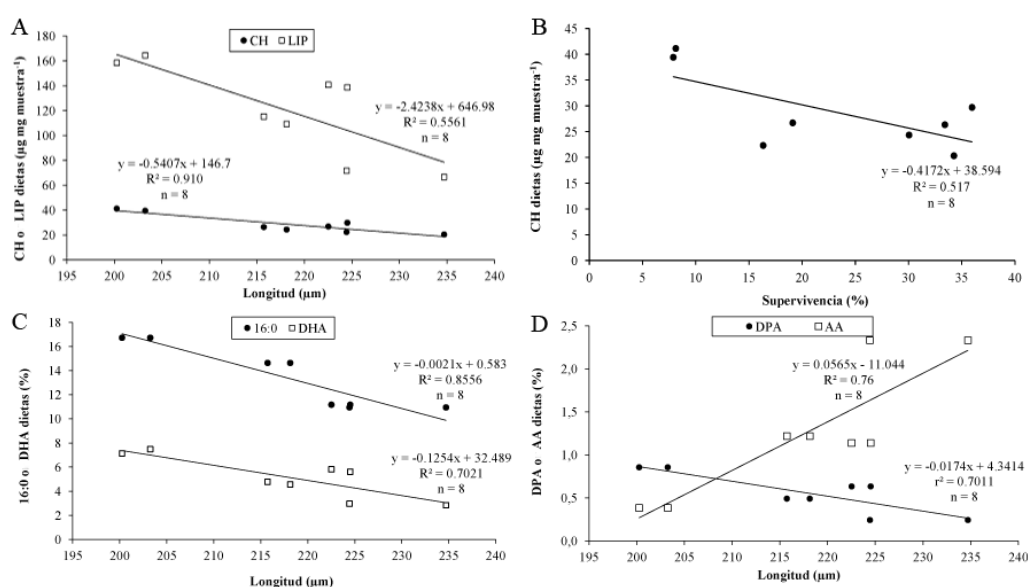


Figura III. 7.- Relación entre los carbohidratos (CH), los lípidos (LIP) (A) (expresado en $\mu\text{g mg muestra}^{-1}$), el 16:0, el DHA (C), el DPA y el ARA (D) (expresado en porcentaje del total de AG) en las dietas, y la longitud (expresada en μm) de las larvas a día 22 de cultivo. Relación entre los carbohidratos (CH) (B) (expresado en $\mu\text{g mg muestra}^{-1}$) en las dietas y la supervivencia de las larvas de *R. decussatus* a día 22.

También existía una correlación positiva entre el contenido proteico de las larvas y la supervivencia larvaria, mientras que el contenido lípidico estaba relacionado negativamente con el crecimiento de las larvas (Fig. III. 8. A y B). Se descubrieron varias correlaciones en los lípidos neutros y polares de las larvas. En la fracción de lípidos neutros, el 16:0 estaba relacionado negativamente con el crecimiento y la supervivencia, mientras que el ARA estaba relacionado positivamente con ambos parámetros del desarrollo larvario (Fig. III. 8. C y D). También se observó una

correlación negativa entre el DHA y DPA, de los lípidos neutros de las larvas, y el crecimiento (Fig. III. 8. E y F).

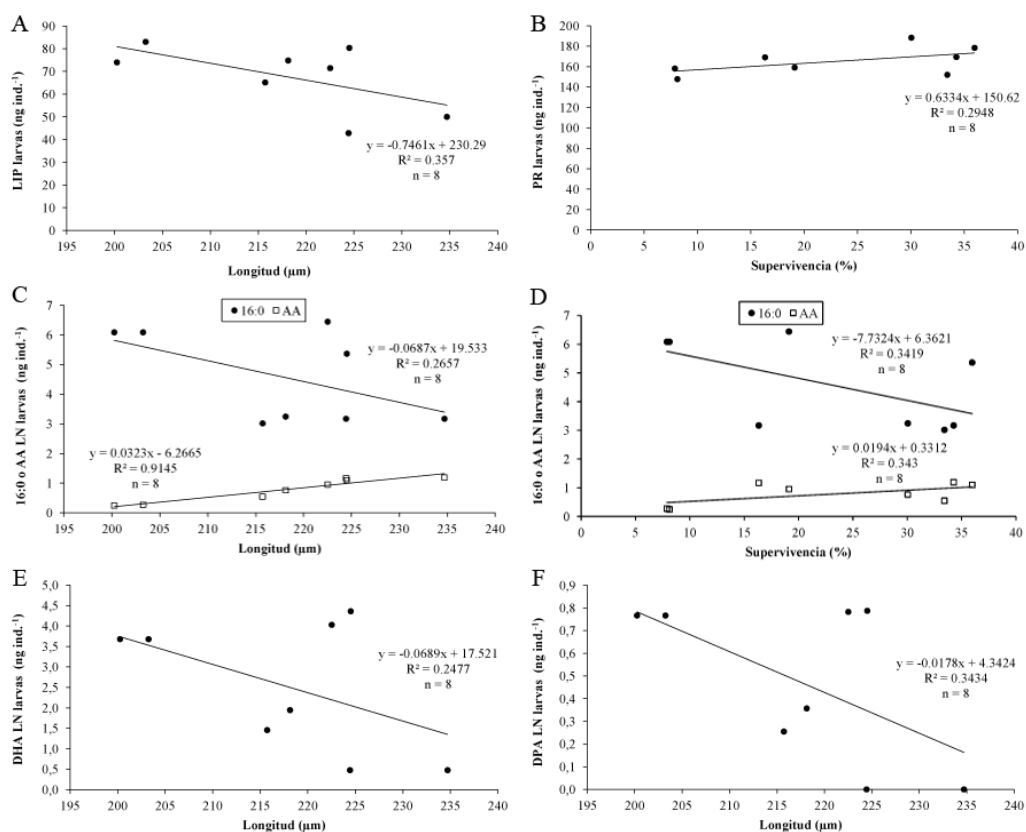


Figura III. 8.- Relación entre los lípidos (LIP) de las larvas (A) (expresado en ng individuo⁻¹), el 16:0, el ARA (C), el DHA (E) y el DPA (F) (expresados en ng individuo⁻¹) en los lípidos neutros (LN) y la longitud de las larvas de *R. decussatus* a día 22. Relación entre las proteínas (PR) de las larvas (B) expresado en ng individuo⁻¹, el 16:0 y el ARA (D) (expresado en ng individuo⁻¹) en los lípidos neutros (LN) de las larvas y su supervivencia a día 22.

Por otro lado, en la fracción polar de los lípidos, el crecimiento y la supervivencia larvaria estaban relacionados positivamente con el 18:0, el ARA, el EPA, el 22:2NMID y los MUFAs (Fig. III. 9. A, B, C, D, F y G). Además, el 18:0dma estaba relacionado positivamente con el crecimiento (Fig. III. 9. E), mientras que los SAFAs y los PUFAs lo estaban con la supervivencia y el crecimiento, respectivamente (Fig. III. 9. F y H).

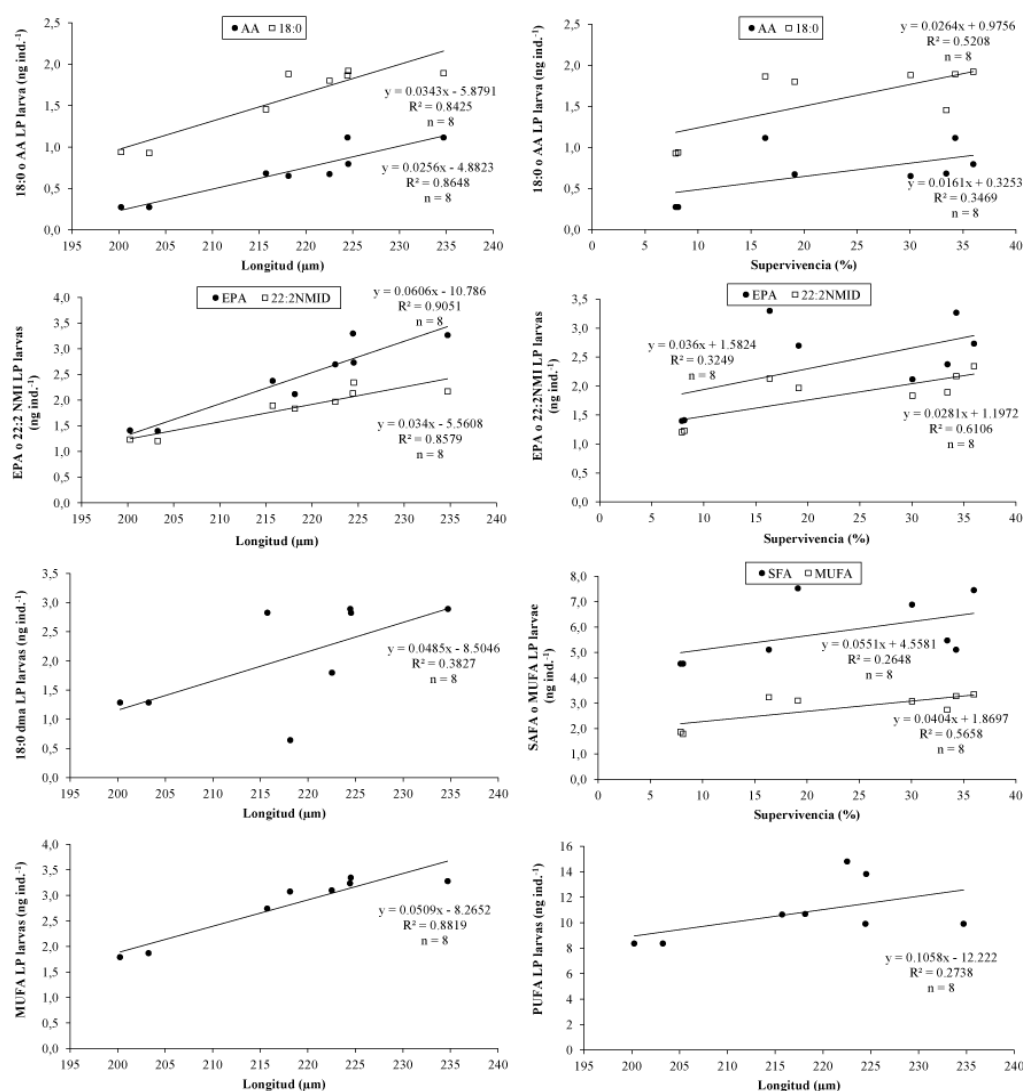


Figura III. 9.- Relación entre el 18:0, el ARA (A), el EPA, el 22:2NMI (C), el 18:0dma (E), MUFA (G) y PUFA (H) (expresados en ng individuo⁻¹) en los lípidos polares (LP) de las larvas de *R. decussatus* y la longitud (expresada en μm) de las mismas a día 22 de cultivo. Relación entre el 18:0, el ARA (B), el EPA, el 22:2NMI (D), SAFA, MUFA (F) (expresados en ng individuo⁻¹) en los lípidos polares (LP) de las larvas de *R. decussatus* y la supervivencia (expresada en %) de las mismas a día 22.

DISCUSIÓN

Efectos de las dietas microalgales en el desarrollo larvario de las larvas de *R. decussatus*

Este estudio muestra que las larvas de *R. decussatus* alimentadas con la dieta IP exhibieron la tasa de crecimiento, la longitud premetamórfica y la supervivencia más baja, mientras que las larvas alimentadas con las dietas que contenían *C. muelleri*, bien sola o bien mezclada con *I. galbana* y *D. lutheri*, (dietas C, IPC e IP2C) presentaron crecimientos y supervivencias más altas.

Igualmente, las larvas de *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791), alimentadas con una mezcla de *I. galbana* y *D. lutheri*, exhibieron peores desarrollos larvarios, en términos de crecimiento y de porcentaje de larvas que alcanzaron la fase de competencia, que las larvas de la misma especie alimentadas con una mezcla de *I. galbana* y *C. muelleri* (Pernet y Tremblay, 2004). De acuerdo con estas observaciones, una mezcla de *I. galbana* (clon T-iso) y *D. lutheri* promovió malos resultados de crecimiento y supervivencia, a la par que menor número de larvas que alcanzaron la competencia, en larvas de *Magallana gigas* (Rico-Villa *et al.*, 2006). Estos mismos autores, también observaron que cuando ambas especies de prymnesiofitos se combinaban con la diatomea *C. calcitrans* forma *pumilum* en la misma dieta, se conseguían mejores desarrollos larvarios. Por otro lado, retirar la especie *C. calcitrans* de la dieta de las larvas de *Mytilus galloprovincialis*, incrementó significativamente la mortalidad y disminuyó el éxito en la fijación y metamorfosis, sin embargo no se observaron diferencias en cuanto a crecimiento (Pettersen *et al.*, 2010)

Sin embargo, larvas de *Pecten maximus* alimentadas con una dieta monoalgal de *I. galbana* (clon T-iso) o de *D. lutheri*, presentaron mayor supervivencia en el estado de competencia y porcentaje de fijación, mientras que en las larvas alimentadas con una dieta monoespecífica de *C. calcitrans*, se observó un mayor crecimiento y menor porcentaje de fijación (Delaunay *et al.*, 1993). Siguiendo esta tendencia, larvas de *R. decussatus* alimentadas exclusivamente con *C. calcitrans*, presentaron una ligera mayor tasa de crecimiento y supervivencia, y menor porcentaje de larvas pediveliger, que las larvas alimentadas únicamente con *I. galbana* (clon T-iso) (Matias *et al.*, 2011). Por lo

tanto, los efectos de las dietas microalgales en el desarrollo larvario parecen ser especie-dependientes y podrían también, ser sensibles a las condiciones del cultivo del fitoplancton empleado, ya que éstas pueden alterar la composición bioquímica y de ácidos grasos de las microalgas.

Efectos de la composición bioquímica y de ácidos grasos de las microalgas sobre el perfil bioquímico y de ácidos grasos de las larvas de *R. decussatus*

La influencia de la composición bioquímica y de ácidos grasos de las microalgas sobre el desarrollo larvario ha sido extensamente estudiada en los moluscos bivalvos (Webb y Chu, 1983; Brown *et al.*, 1997; Robert y Trintignac, 1997b; Pernet y Tremblay, 2004; Spolaore *et al.*, 2006).

En este estudio, las dietas IP e IPC eran más ricas en lípidos totales, mientras que las dietas IP2C y C mostraron una mayor proporción de proteínas. A pesar de que en los trabajos de nutrición con microalgas, raramente se estudia el efecto de las proteínas en el desarrollo larvario, existen algunos estudios que vinculan las dietas, con elevada cantidad de proteínas, con las mejoras en crecimiento y supervivencia larvaria. Así, en *M. gigas* y *Argopecten purpuratus* (Utting, 1986; Uriarte *et al.*, 2004) se observó esto. En este trabajo, las larvas alimentadas con dietas ricas en proteínas (IP2C y C) presentaron un crecimiento y supervivencia altos, aunque también las larvas alimentadas con IPC (con cantidades más bajas de proteínas y lípidos que las otras dietas con *C. muelleri*) obtuvieron desarrollos larvarios buenos. De todas formas, las diferencias en el contenido proteico de las dietas, no parece alterar el contenido proteico de las larvas al final del experimento. Sin embargo, la cantidad de proteínas de las larvas está positivamente relacionada con la supervivencia larvaria.

Contrariamente a esto, parece haber una relación negativa entre el contenido lipídico de las dietas y la acumulación de lípidos en larvas de *R. decussatus* a los 22 días. Por ejemplo, la baja proporción de lípidos observada en la dieta C, promovió una baja acumulación de los mismos en las larvas, pero también se observó un alto rendimiento en las larvas alimentadas con esa dieta. Sin embargo, y a pesar de que las larvas alimentadas con IP almacenaron más lípidos totales debido a la alta proporción de los mismos en la dieta, se registraron peores resultados de crecimiento y

supervivencia en este grupo. Además, en este trabajo se observó una relación negativa entre los lípidos totales de las dietas ensayadas y el crecimiento de las larvas. Esto puede sugerir que los lípidos totales de las dietas no son buenos indicadores de la supervivencia larvaria en *R. decussatus* y que las cantidades y/o proporciones de componentes lipídicos específicos pueden explicar las diferencias en la supervivencia larvaria, ya que los ácidos grasos esenciales parecen ser un factor limitante. Dietas con alto contenido en lípidos se emplearon para alimentar larvas de *Argopecten purpuratus* (Nevejan *et al.*, 2003) y *Pecten maximus* (Delaunay *et al.*, 1993), obteniéndose pobre crecimiento cuando el EPA y el DHA estaban ausentes.

La bibliografía disponible sobre el desarrollo larvario de los moluscos bivalvos no ha abordado en profundidad el estudio del efecto de los carbohidratos de la dieta. Muchos autores han sugerido que los carbohidratos no juegan un papel importante durante el desarrollo larvario en bivalvos (Holland y Spencer, 1973; Gallagher *et al.*, 1986). Sin embargo, Whyte *et al.* (1989) señalan que los carbohidratos de la dieta pueden jugar un papel importante en el equilibrio necesario en las larvas, entre el uso de las proteínas y los lípidos para la biosíntesis y su catabolismo para la producción de energía. A pesar de que algunos autores han destacado la importancia de las microalgas con alto contenido en hidratos de carbono para el crecimiento, como Utting (1986) en larvas de *M. gigas* y Whyte *et al.* (1989) en *Mizuhopecten yessoensis*, nuestros resultados mostraron una correlación negativa entre el crecimiento y la supervivencia, y los carbohidratos de la dieta. No obstante, el contenido de carbohidratos de las larvas no se correlacionó ni con el crecimiento de larvas ni con la supervivencia.

C. muelleri proporcionó altos niveles de 20:5(n-3) EPA y bajos niveles de 22:6(n-3) DHA. El DHA de las dietas y el DHA de los lípidos neutros de las larvas estuvieron negativamente relacionados con el crecimiento de las larvas. Sin embargo, el contenido de EPA en los lípidos polares de las larvas estuvo positivamente relacionado con el crecimiento y la supervivencia. Rico-Villa *et al.* (2006) mostraron como valores óptimos, para un buen desarrollo larvario de *M. gigas*, en el contenido de las larvas de EPA (7-17% del total de AG) y de DHA (7-14% del total de AG). Nuestros resultados (datos no presentados) sugieren que el EPA debería ser más importante (en torno al 15-20% del total de los AG en las larvas) que el DHA (4-11% del total de AG), para un

buen desarrollo larvario en *R. decussatus*. Esta afirmación se ve reforzada con la correlación del EPA y el DHA con el desarrollo larvario presentado en nuestro estudio.

La acumulación de DHA en los lípidos polares de las larvas alimentadas con las dietas con bajo contenido de DHA, puede ser compensada por la retención de ácidos grasos de otro tipo, como el EPA, como se observó en el presente estudio y en larvas de *P. maximus* alimentadas con *C. calcitrans*, sin aparentes efectos negativos sobre el crecimiento, aunque con menor porcentaje de fijación (Delaunay *et al.*, 1993). Por otra parte, el EPA de la dieta y de las larvas de *P. magellanicus* influyó positivamente el crecimiento larvario (Pernet *et al.*, 2005). Sin embargo, Fernández-Reiriz *et al.* (2011) puso de relieve que las larvas de *Venerupis corrugata* alimentadas con *Tetraselmis suecica*, una dieta deficiente en DHA, presentaban un bajo crecimiento y alta mortalidad.

El contenido de 20:4(n-6) ARA en las larvas de *R. decussatus* reflejó, claramente, la proporción del mismo en sus dietas. La presencia de *C. muelleri* en la dieta aumentó la acumulación de ARA en los lípidos neutros y polares de las larvas. La dieta C contenía el 2,3% de ARA, mientras que la dieta IP, deficiente en ARA, contenía el 0,3%. Cuanto mayor fue la proporción de ARA en las dietas, mayor crecimiento larvario se obtuvo (coeficiente de correlación de 0,879 ($n = 8$), tabla III. 7). El contenido en ARA, de los lípidos neutros y polares, de las larvas de 22 días de edad se relacionó positivamente con el crecimiento, al igual que un mayor nivel de ARA acumulado en los lípidos de membrana se correspondió también con una mayor supervivencia de las larvas de *R. decussatus*. La importancia del ARA en las especies de invertebrados es debido a su papel en la producción de eicosanoides y en la respuesta al estrés (Howard y Stanley, 1999). Varios estudios sugieren que los efectos perjudiciales de la deficiencia de ARA afectan fundamentalmente a la supervivencia y resistencia a los patógenos (Pernet *et al.*, 2005). Por ejemplo, la baja supervivencia y crecimiento de larvas de *P. magellanicus* se observó bajo una dieta pobre en ARA (0,41%) (Pernet y Tremblay, 2004). Por otra parte, se ha visto que el ARA juega un papel importante para estimular el crecimiento en larvas de *Mytilus galloprovincialis* (Pettersen *et al.*, 2010) y en postlarvas de *P. magellanicus* (Milke *et al.*, 2008).

En las larvas alimentadas con la dieta C se registró una mayor acumulación de 22:5(n-3) en los lípidos polares, aunque este ácido graso no estaba presente en ninguna de las dietas. El ácido graso 22:5(n-3) fue incorporado selectivamente en fosfatidilcolina en las gónadas masculinas de *P. maximus* (Soudant *et al.*, 1997). Estos autores sugieren un origen endógeno para el 22:5(n-3), biosintetizado a partir de la elongación del EPA, la cual también se ha descrito en las larvas de peces (Watanabe *et al.*, 1989). Este proceso de elongación podría contribuir a la rectificación de la deficiencia dietética en DHA con algún ácido graso de estructura próxima al anterior (Soudant *et al.*, 1997). Las larvas alimentadas con la dieta C, una dieta rica en EPA, pueden destinar una parte de este ácido graso ingerido para su conversión en 22:5(n-3), como sugieren Soudant *et al.* (1997), y/o pueden regular los niveles de EPA como una estrategia para evitar la competencia en la producción de eicosanoides derivados del ARA, gracias a la menor actividad de los homólogos generados a partir del EPA.

El 22:5 (n-6) DPA no se encontró en los lípidos neutros, y se registró en niveles bajos en los lípidos polares de las larvas alimentadas con la dieta C, debido a los bajos niveles de este ácido graso en esta dieta. Existe entonces una relación inversa entre el crecimiento y el contenido en DPA, tanto de la dieta como de los lípidos neutros en las larvas de *R. decussatus*. La acumulación de DPA fue registrada en los lípidos polares de las larvas de *P. maximus* (Delaunay *et al.*, 1993) y *P. magellanicus* (Pernet *et al.*, 2005), por lo tanto, se sugiere un papel específico para este ácido graso en las membranas celulares. Por lo tanto, el DPA, en los lípidos polares, puede cumplir un papel funcional homólogo al DHA, con posibles efectos sobre la función de las proteínas transmembrana (Pernet *et al.*, 2005). Al contrario, parece que en larvas de *R. decussatus*, el DPA no juega este último papel, ya que las larvas con menores niveles de DHA (larvas alimentadas con la dieta C) son las que tienen menores niveles de DPA en la fracción de lípidos polares.

El ácido dimetil acetal 18:0dma se encontró en alta proporción, y se acumula en gran medida en los lípidos polares de las larvas de *R. decussatus* alimentadas con la dieta C. Este compuesto se originó a partir de la transmetilación de cadenas 1-alquenilo de plasmalógenos, un tipo de éter, que contiene fosfoglicéridos, y que se encuentra en las membranas de las células animales. La abundancia de plasmalógenos en los moluscos se ha descrito previamente (Joseph, 1982; Kraffe *et al.*, 2004). Sin embargo,

la información relativa a su función biológica es todavía limitada. Se cree que estos plasmalógenos desempeñan un papel como componentes de las membranas, y algún éter ligado a los lípidos, parece servir como sitio de almacenamiento protegido para los PUFAs. La baja proporción de DHA, en los lípidos polares de las larvas alimentadas con la dieta C, puede explicar, parcialmente, el enriquecimiento de 18:0dma en esta fracción lipídica, con el fin de modular la dinámica de la membrana. De hecho, este ácido graso es el que exhibió el segundo mayor incremento en los lípidos polares de las larvas alimentadas con esta dieta (2,8 ng individuo⁻¹, Tabla III. 6), mientras que en las otras dietas, su incorporación en las membranas osciló entre 0,9 y 1,8 ng individual⁻¹ (cuarto incremento en importancia en los lípidos polares). Por lo tanto, se pone de relieve la importancia del 18:0dma en lípidos polares de las larvas de *R. decussatus*, independientemente de la dieta suministrada. Por otra parte, el ácido graso 18:0dma en los lípidos polares de las larvas, se relaciona positivamente con el crecimiento de las larvas. De acuerdo con nuestros resultados, el ácido graso dimetil-acetal, cuantitativamente más importante, en *Ruditapes philippinarum* (Caers *et al.*, 1999c), *A. purpuratus* (Caers *et al.*, 1999b, a) y *M. gigas* (Caers *et al.*, 2000) también es el 18:0dma.

Nuestros resultados mostraron bajos niveles de NMIDs en los lípidos neutros, y altos niveles en los lípidos polares de larvas de *R. decussatus* (7,4 a 10,7% del total de ácidos grasos en los lípidos polares), con niveles muy bajos de 20:2NMID comparado con la cantidad de 22:2NMID. Los niveles más altos de 22:2NMID se observaron en las larvas alimentadas con las dietas que contenían *C. muelleri* (C, IPC y IP2C), con niveles máximos en las larvas alimentadas con la dieta C. Esto puede estar relacionado con la disminución de los niveles de DHA en las larvas alimentadas con la diatomea *C. muelleri* (deficiente en DHA). En las larvas de longueirón vello *Solen marginatus* (Pulteney, 1799), se observó una relación inversa entre los niveles de 22:2NMID y los principales PUFAs, EPA y DHA (da Costa *et al.*, 2011). Del mismo modo, Klingensmith (1982) señaló la misma tendencia en los tejidos de la almeja *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758). En nuestro estudio, el EPA no estaba relacionado con los niveles de NMIDs, ya que las larvas alimentadas con la dieta C exhibieron los niveles más altos de ambos, EPA y NMIDs. Contrariamente a la baja capacidad de sintetizar los PUFAs detectada en algunos bivalvos (Laing *et al.*, 1990; Delaunay *et al.*, 1993), los NMIDs son sintetizados “de novo” en los bivalvos por elongación y $\Delta 5$ desaturación de

16:1(n-7) y 18:1(n-9), los cuales son abundantes en el fitoplancton, especialmente en las diatomeas (Zhukova, 1991). De manera similar, Caers *et al.* (1999c) registraron que la semilla de *R. philippinarum* sintetizó activamente NMIDs independientemente de la dieta suministrada. En nuestro estudio, todas las dietas proporcionaban altos niveles de los precursores 16:1(n-7) y 18:1(n-9) (la suma de ambos fue entre el 18 y el 20% del total de ácidos grasos de las dietas) para la producción de NMIDs, sin embargo, las larvas alimentadas con las dietas que contenían *C. muelleri* (C, IPC y IP2C) incorporaron dos veces más 22:2NMIDs en sus membranas que las larvas alimentadas con la dieta IP (2 vs 1,1 ng individuo⁻¹). Aunque poco se conoce sobre la función de los ácidos grasos NMIDs, numerosos estudios coinciden en su papel estructural y funcional en las membranas biológicas (Paradis y Ackman, 1977; Klingensmith, 1982; Pirini *et al.*, 2007). Kraffe *et al.* (2004) propusieron para los ácidos grasos NMI propiedades importantes de las membrana, tales como, la temperatura de transición de fase, la fluidez de membrana, o la actividad de las proteínas unidas a la membrana. Se puede sugerir entonces, que los NMIDs en las larvas de *R. decussatus* se incrementaron cuando ciertos PUFAs eran deficientes (por ejemplo el DHA en las larvas alimentadas con dietas que contenían *C. muelleri*). Por otra parte, en nuestro estudio, se observó una correlación positiva entre el 22:2NMID en los lípidos polares de las larvas y el rendimiento larvario (es decir, crecimiento y supervivencia), lo que sugiere la importancia de estos ácidos grasos en larvas de *R. decussatus*. Del mismo modo, Fernández-Reiriz *et al.* (2011) destacaron una función importante para los NMID en la determinación del peso de las larvas de *V. corrugata*. También los NMIDs son importantes para las larvas de *S. marginatus* que se mantienen en condiciones de ayuno (da Costa *et al.*, 2012). Además, como sugieren estos autores, las larvas de *S. marginatus* parecen estar genéticamente impulsadas a biosintetizar NMIDs durante el desarrollo larvario, independientemente de los precursores suministrados por la dieta, encontrándose altos niveles en ambas fracciones lipídicas.

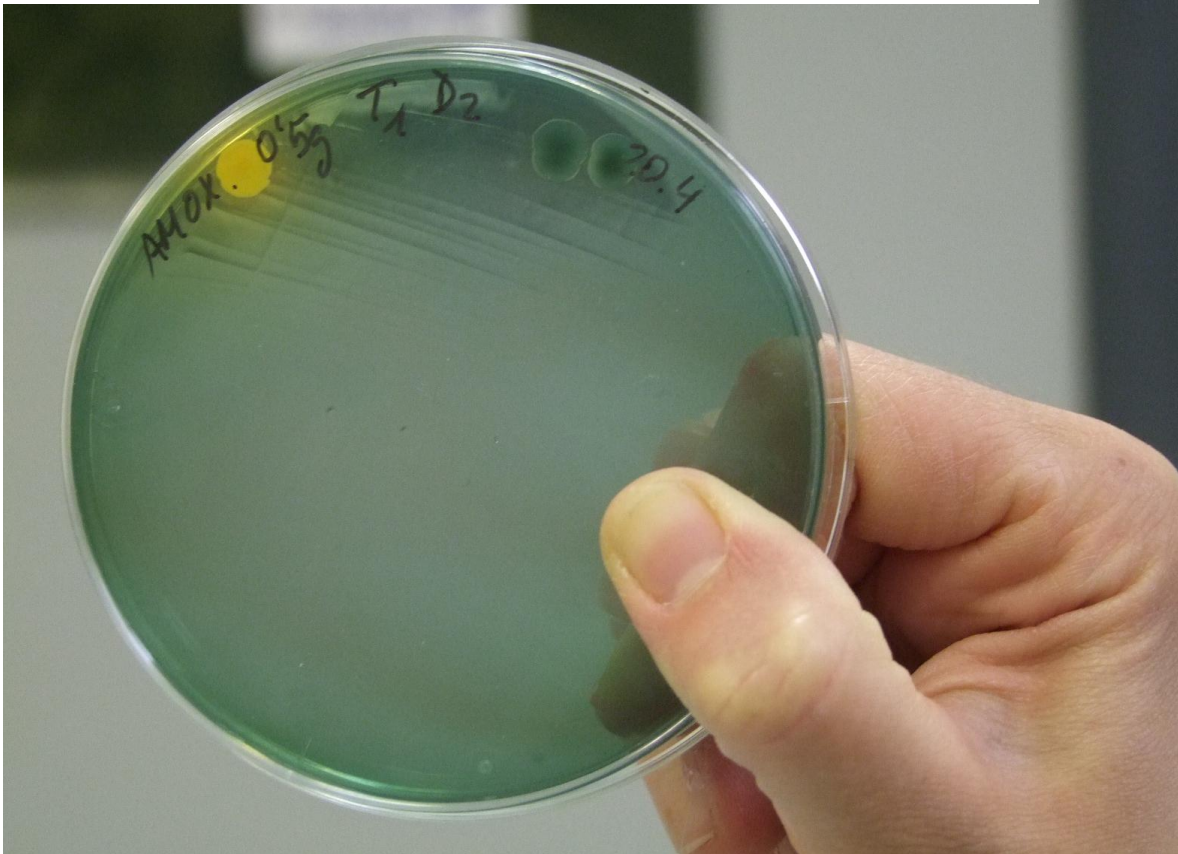
En resumen, este capítulo demuestra la importancia de la composición de la dieta en el desarrollo larvario de *R. decussatus*, cobrando especial importancia la presencia de alguna microalga diatomea como puede ser la especie *C. muelleri*. De aquí en adelante, deben llevarse a cabo más estudios nutricionales, a lo largo del desarrollo larvario de *R. decussatus*, con el fin de mejorar (1) nuestro conocimiento sobre la nutrición de las larvas de almeja y (2) el rendimiento del cultivo de esas larvas. También

ha quedado demostrado que la composición bioquímica puede influir mucho en el rendimiento larvario, así el aumento de lípidos y carbohidratos en la dieta pueden reducir el crecimiento larvario y la supervivencia, respectivamente. Este estudio también ha demostrado que las deficiencias de DHA en la dieta, pueden no tener efectos perjudiciales sobre el desarrollo de las larvas, ya que éstas fueron capaces de modular la composición de la membrana mediante el aumento de la proporción de EPA, 18:0dma, 22:5(n-3) y 22:2NMID, en los lípidos polares. Además de esto, nuestros hallazgos sugieren la importancia, para las larvas de *R. decussatus*, tanto del ARA de la dieta como del ARA de los lípidos neutros y polares de las mismas larvas, debido a su relación positiva con el crecimiento y/o la supervivencia.





Microbiología asociada al acondicionamiento





INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que desde su inicio se ha encontrado el cultivo de bivalvos en criaderos, son los continuos episodios de mortalidades masivas que se detectan sobre todo en la etapa larvaria, y que reducen considerablemente la producción, llegando a provocar en algunos casos, la pérdida total del lote a cultivar. En muchas de estas epizootias se han identificado bacterias patógenas del género *Vibrio* como el agente etiológico responsable de dicha enfermedad, denominada vibriosis (Dubert *et al.*, 2017; Dubert *et al.*, 2016a).

Para prevenir estos episodios, es esencial detectar las rutas por las que estas bacterias patógenas pueden llegar a los sistemas de cultivo. Las principales vías de entrada son tres: el agua de mar, las microalgas empleadas como alimento y los ejemplares reproductores acondicionados en el criadero. Las dos primeras siempre han sido objeto de atención, y con el avance de la acuicultura en general y de la venericultura intensiva en particular, se han logrado desarrollar sistemas y protocolos con los que se establece un control microbiológico eficaz, tanto en el agua como en los cultivos auxiliares de algas. Sin embargo hay pocos estudios en los que se profundice en la microbiota de los reproductores, así como su papel en la transferencia de potenciales patógenos a las larvas mediante transmisión vertical bacteriana (Dubert *et al.*, 2016b).

Microbiota bacteriana en los cultivos de bivalvos en criadero: influencia de los vibrios

Debido a su naturaleza filtradora los bivalvos acumulan de forma natural en el medio ambiente acuático una microbiota importante y diversa, compuesta por especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Actinobacter*, *Photobacterium*, *Moraxella*, *Aeromonas*, *Micrococcus* y *Bacillus* (Romalde *et al.*, 2012).

La primera vez que se analizó la microbiota asociada a una especie de molusco bivalvo (*Magallana gigas*), se llevó a cabo en 1960 por Colwell y Liston. Estos observaron una alta proporción de bacterias Gram negativas (>80%), predominando los

géneros *Pseudomonas* y *Vibrio*. Más tarde, Sugita *et al.* (1981) estudiaron la microbiota asociada de seis especies de bivalvos (*Ruditapes philippinarum*, *Macra quadrangularis* (Reeve, 1854), *Mytilus coruscus* (Gould, 1861), *M. gigas*, *Phascolosoma noduliferum* (Stimpson, 1855) y *Anadara broughtonii* (Schrenck, 1867)), así como del agua y del sedimento en el que se encontraban en la bahía de Tokyo. Estos autores descubrieron que la composición microbiológica en los moluscos era la misma que en el agua y en los sedimentos, aunque con diferencias cuantitativas y que en general, los grupos de bacterias predominantes eran anaerobias facultativas, pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Moraxella* y *Micrococcus*. También concluyeron que la microbiota de estos moluscos estaba fuertemente influenciada por las condiciones del medio en el que habitaban.

El género *Vibrio* incluye las principales especies patógenas que afectan a los moluscos bivalvos en sus distintos estadios (larvas, juveniles y/o adultos). Muchas de estas especies han sido descritas como patógenos oportunistas capaces de proliferar rápidamente en los cultivos de bivalvos provocando mortalidades elevadas en períodos cortos de tiempo (Allam y Ford, 2006; Allam *et al.*, 2006; Waechter *et al.*, 2002; Anguiano *et al.*, 2010; Estes *et al.*, 2004; Gay *et al.*, 2004a; Gay *et al.*, 2004b; Paillard *et al.*, 2004; Gómez-León *et al.*, 2008; Prado *et al.*, 2005; Prado *et al.*, 2014a; Prado *et al.*, 2014b; Dubert *et al.*, 2016a; Garnier *et al.*, 2007). Con respecto a la almeja fina, *Ruditapes decussatus*, la mayoría de los estudios en criadero se han centrado sobre los cultivos de larvas, semilla y juveniles en los que se han descrito especies patógenas como *V. europaeus*, *V. bivalvicida*, o *V. splendidus* (Dubert *et al.*, 2017; Dubert *et al.*, 2016a; Dubert *et al.*, 2016b; Gómez-León *et al.*, 2005). Por otro lado, en el medio natural esta especie puede verse afectada por *V. tapetis* durante su estadio adulto (Paillard *et al.*, 2004).

Con respecto al estadio larvario, Dubert *et al.* (2016a) demostraron que la vibriosis en larvas es asintomática durante las primeras etapas de la enfermedad. Además, estos autores observaron que una vez que las larvas manifiestan los primeros signos de enfermedad la proliferación del patógeno está ya muy avanzada, de tal manera que los lotes no pueden ser tratados. Esto genera un problema, ya que en la rutina del criadero no es fácil y en muchos casos viable, distinguir las especies patógenas o cepas virulentas de aquellas que realmente no lo son. Sin embargo, hay evidencias que

sugieren que el factor cuantitativo es un indicativo importante. De hecho, los bivalvos pueden tolerar concentraciones bajas de un determinado patógeno sin desarrollar la enfermedad (Paillard *et al.*, 2004). De esta manera el control de los cultivos mediante siembras en TCBS resulta una herramienta sencilla y práctica para determinar la concentración de vibrios existente.

Acondicionamiento de reproductores desde un punto de vista microbiológico

Con respecto a los reproductores, el acondicionamiento es fundamental si queremos contar con larvas para su cultivo fuera de la época de puesta natural. Las técnicas que se emplean van enfocadas a promover el desarrollo gonadal y la gametogénesis, modificando factores físicos como la temperatura del agua y la disponibilidad de alimento. Diferentes estudios revisados por da Costa *et al.* (2012), demostraron que el acondicionamiento de reproductores de *R. decussatus* a una temperatura alta y constante (20°C), o bajo un incremento gradual desde la temperatura del medio natural hasta la temperatura de acondicionamiento (20°C), constituyen dos buenas alternativas para obtener adultos maduros sexualmente, y aunque existen numerosos trabajos que hablan sobre los efectos de estos factores durante el acondicionamiento y maduración de diferentes especies de bivalvos (Utting y Millican, 1997; Utting y Millican, 1998; Ojea *et al.*, 2008; Ojea, 2013), no hay prácticamente ningún estudio en el que se profundice en cómo estos factores afectan e influyen sobre la microbiota de las almejas acondicionadas.

El tiempo de acondicionamiento en un criadero está determinado por el estado reproductivo de los progenitores a su llegada y estabulación, es decir, en individuos que están maduros al extraerlos del medio natural, el período de acondicionamiento será más corto que en aquellos que no lo estén, de ahí que en estos casos, sea de vital importancia reducir rápidamente la carga de vibrios asociada a los reproductores, antes de que se produzca el desove, y así minimizar el riesgo potencial de la transmisión vertical bacteriana a los cultivos larvarios. De hecho, muchas de estas bacterias pueden ser inofensivas para los reproductores pero virulentas para las larvas. Dicha transmisión, incluyendo a vibrios, ha sido demostrada en cultivos de distintos moluscos bivalvos como *Pecten maximus* (Sandaa *et al.*, 2008), *Panopea abrupta* (Conrad, 1849),

Ruditapes philippinarum, *Magallana gigas*, *Hizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857) (Schulze *et al.*, 2006) y *Ruditapes decussatus* (Dubert *et al.*, 2017).

Actualmente, es muy frecuente el uso de antibióticos para reducir la carga bacteriana de los reproductores acondicionados (González-Araya *et al.*, 2012; Holbach *et al.*, 2015), pero supone una medida profiláctica cara, y además su eficiencia está altamente cuestionada debido al rápido desarrollo de bacterias resistentes, incluyendo potenciales vibrios patógenos (Berthe, 2005; Dubert *et al.*, 2016b); sin olvidar el riesgo medioambiental derivado del uso de antibióticos en un criadero que no cuente con un sistema de tratamiento de efluentes eficiente (Dubert *et al.*, 2016b). De este modo, como alternativa cobra especial relevancia el desarrollo de protocolos microbiológicos “*eco-friendly*” que favorezcan la reducción de la carga bacteriana asociada a los reproductores durante su acondicionamiento, particularmente las especies del género *Vibrio*.

Con este objetivo fueron diseñadas las pruebas en las que se centra el siguiente capítulo. Una primera experiencia en la que se evaluó el efecto sobre la concentración de vibrios de diferentes protocolos de acondicionamiento, variando la temperatura y el alimento suministrado. Y una segunda, que siendo continuación de la anterior, se divide en dos partes, por un lado, se escogió el sistema de acondicionamiento que mejores resultados bacteriológicos ofreció en la primera prueba y sobre éste, se ensayaron varios regímenes alimenticios con la intención de optimizar el acondicionamiento desde un punto de vista microbiológico y fisiológico. Y por otro lado, se evaluó el efecto de una depuración, previa a la obtención de los gametos, sobre la viabilidad de su posterior cultivo larvario así como la potencial transmisión vertical bacteriana.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del acondicionamiento y muestreo de los reproductores

Se diseñaron dos pruebas (Fig. IV. 1A y B) en años consecutivos, con el objetivo de optimizar el acondicionamiento, durante cuatro semanas en el criadero, de reproductores de almeja fina, *Ruditapes decussatus*. Para ambas experiencias, se emplearon ejemplares adultos extraídos de un banco natural en la localidad de Illa de Arousa (Galicia, NO de España). Tras su recolección, las almejas se transportaron en frío (4-10°C) a las instalaciones del Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo, donde fueron acondicionadas bajo cuatro condiciones diferentes de temperatura y alimentación (Fig. IV 1A y B).

Una vez allí, los progenitores se estabularon en tanques de 200 L de capacidad, con circuito abierto de agua (renovación de 20 L/h/Kg) filtrada por filtro de arena (1 µm) y esterilizada por UV, con una salinidad de 32-33‰ y aireación constante. El fotoperíodo fue de 12h:12h (luz:oscuridad) durante todo el acondicionamiento. La alimentación suministrada, de manera constante durante las dos pruebas, consistió en una mezcla a igual proporción, de *Isochrysis galbana*, *Diacronema lutheri*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros* sp. y *Skeletonema marinoi*. La ración diaria representó el 6% del peso seco de la carne de los reproductores en peso seco de las microalgas.

Prueba 1 (mayo – junio 2011)

Para abordar la primera prueba se emplearon ejemplares con una longitud media de 43.5 ± 3.3 mm. Después de su extracción el 19 de mayo, las almejas se acondicionaron bajo cuatro protocolos de temperatura y alimentación diferentes. Cada uno de estos tratamientos se probó por duplicado. Se repartieron un total de 560 ejemplares entre los ocho tanques a una proporción de 1,3 kg/tanque (70 almejas/tanque) y se acondicionaron durante cuatro semanas. Durante las dos primeras semanas (Fig. IV. 1A), las almejas se acondicionaron en cuatro grupos con diferentes condiciones de temperatura y alimento: dos con un incremento gradual de 0,3°C al día (de 14,5°C hasta 20°C), con alimento (A) y sin alimento (B), y otros dos grupos con una temperatura constante de 20°C con alimento (C) y sin alimento (D). Tras estas dos primeras semanas de acondicionamiento, las condiciones de estabulación se igualaron

en todos los grupos, y se mantuvieron así durante las dos semanas restantes hasta el final de la prueba.

Para evaluar los efectos que la variación de estos dos factores tenía sobre el acondicionamiento, se realizaron tres muestreos durante el experimento: antes de comenzar el acondicionamiento (muestreo T_0), a las dos semanas de su inicio (muestreo T_1) y al finalizar la prueba a las cuatro semanas (muestreo T_2), en los que se muestrearon las gónadas de diez almejas de cada tanque en una proporción de 1:1 (macho:hembra) para determinar el sexo, el estadio de desarrollo gonadal (EDG) y para los análisis microbiológicos.

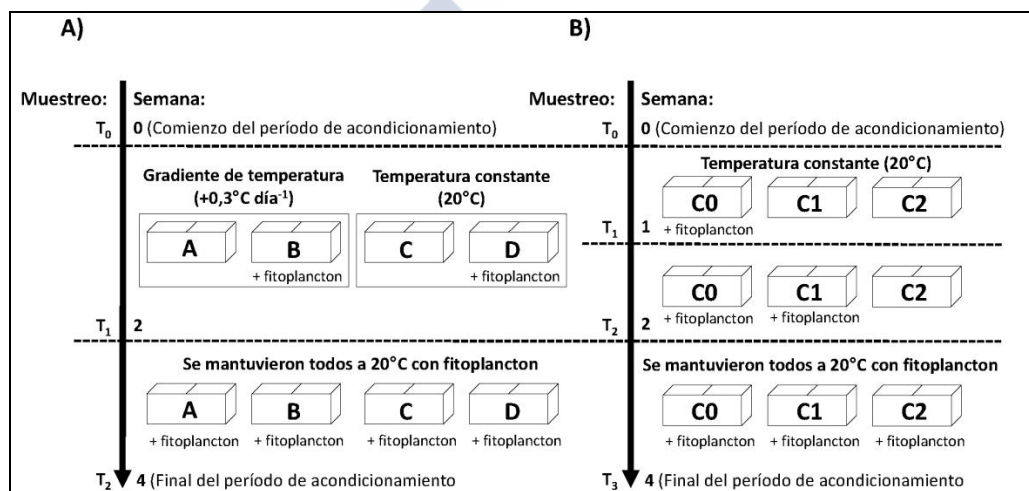


Figura IV. 1.- Diseño del acondicionamiento de las pruebas de 2011 (A) y 2012 (B), variando las condiciones de temperatura y alimentación.

Prueba 2 (mayo – junio 2012)

En esta segunda prueba, se eligió el acondicionamiento que mejores resultados bacteriológicos nos había ofrecido en la prueba del año anterior (Fig. IV. 1B), y siguiendo este modelo como base, se reevaluó el tiempo de depuración, es decir el tiempo sin aporte de fitoplancton, durante el acondicionamiento.

Para afrontar esta experiencia, se probaron por duplicado tres estrategias de alimentación durante el acondicionamiento. Se repartieron un total de 390 almejas adultas (longitud media de $49,1 \pm 3,5$ mm) en seis tanques a una proporción de 1,7 kg/tanque (65 almejas/tanque) y se acondicionaron durante cuatro semanas a una

temperatura constante de 20°C. Para la alimentación de los reproductores estabulados se empleó la misma mezcla de fitoplancton que para la prueba 1. Ésta se aportó al primer grupo (C0) desde el comienzo del acondicionamiento (= grupo D – prueba 1) (Fig. IV. 1A y B). Los otros dos grupos se mantuvieron sin alimento durante la primera semana en el acondicionamiento C1 y durante las dos primeras en el acondicionamiento C2 (= grupo C – prueba 1) (Fig. IV. 1B), de manera que estuvieron depurando durante ese período inicial del acondicionamiento. Después de estas dos primeras semanas, los factores físicos de temperatura y alimentación se unificaron en los tres grupos y así se mantuvieron hasta el final de la prueba (Fig. IV. 1B).

Al igual que en la prueba del año anterior, se evaluaron el sexo, el EDG y los análisis microbiológicos, pero en este caso se emplearon seis almejas (con una proporción 1:1; macho:hembra) de cada tanque, al comienzo de la prueba (Muestreo T₀), después de la primera semana (Muestreo T₁), tras la segunda semana (Muestreo T₂) y al final de la experiencia a las cuatro semanas (Muestreo T₃) (Fig. IV. 1B).

Inducción a la puesta, obtención de gametos y transformación a larva D

De todos los grupos de reproductores ensayados en esta segunda prueba, se escogieron los pertenecientes a los grupos C0 y C2 para evaluar los posibles efectos beneficiosos de una depuración previa a la inducción y obtención de gametos sobre el posterior cultivo larvario.

Para inducir el desove, primero se limpiaron los reproductores y se mantuvieron en seco y frío (4°C) durante 12 h. Pasado este tiempo, se colocaron las almejas en una bandeja, con agua de mar esterilizada mediante UV, en la que se realizó la técnica conocida como “*choque térmico*”, para lo cual se sometió a los reproductores a cambios bruscos de temperatura. Durante 2 h se mantuvo la temperatura del agua a 25°C, después se redujo a 14°C durante 30 minutos. Se necesitaron dos ciclos como éste para obtener la puesta. Además de esta técnica térmica, se añadieron otros estímulos como gametos obtenidos mediante el raspado de la gónada de uno de los reproductores acondicionados, así como una mezcla del fitoplancton que se empleaba como alimento durante el acondicionamiento.

En el momento en el que las almejas comenzaron a liberar sus gametos, se transfirieron a receptáculos individuales donde terminaron de liberar el esperma o los huevos, evitando que ocurriera la fertilización espontánea tras el desove. Una vez que terminó la puesta, el esperma de varios machos se mezcló y se añadió a un tanque con agua a 20°C, en el que ya habíamos inoculado todos los huevos obtenidos, y así conseguimos que la fecundación fuera, más o menos, sincrónica. Tras la fertilización, los huevos se tamizaron a través de una malla de 45 µm para eliminar el exceso de esperma. El número total de huevos fecundados se determinó mediante el conteo de cinco réplicas tanque⁻¹, y después los embriones se transfirieron a un tanque de 500 L para iniciar el cultivo larvario. Estos tanques se mantuvieron con agua de mar filtrada y esterilizada por UV, a 20°C, y la densidad a la que se ajustó fue de 30 embriones mL⁻¹. Durante estas primeras horas de incubación no se añadió fitoplancton a los tanques. A las 48 h. post-fertilización, se calculó el porcentaje de transformación a larva-D, estimándolo en base al número total de larvas-D que quedaron retenidas en una malla de 60 µm.

Análisis histológicos. Determinación del sexo y del estado de desarrollo gonadal (EDG)

La maduración gonadal se evaluó mediante técnicas de histología clásica (Esquema IV. 1). Una vez diseccionadas las almejas, se separó la gónada para realizar cortes del tejido gonadal de 5 µm de grosor con un microtomo, para ello, previamente se introdujeron las gónadas en fijador Davidson y después se incluyeron en parafina. Una vez realizados los cortes, se tiñeron con Hematoxilina-Eosina y se observaron mediante microscopía óptica (20x).

El estadio de desarrollo gonadal (EDG) de cada muestra se asignó siguiendo la escala gametogénica propuesta por Wilson y Seed, 1974, pero ligeramente modificada por Ojea (2013) para adaptarla al uso en criadero de esta especie de bivalvo: estadio 0 (reposo sexual), 1 (inicio de gametogénesis), 2 (gametogénesis avanzada), 3 (madurez), 4 (puesta) y 5 (postpuesta o restauración).

Análisis microbiológicos

Para los análisis microbiológicos que se realizaron en cada muestreo, se emplearon fragmentos de 0,08-0,1 g de tejido gonadal, que se homogeneizaron y diluyeron 1:10 (v/v) asépticamente en agua de mar estéril. De esta dilución, se tomaron 100 μ L que se sembraron en dos medios, por un lado en placas de Agar Marino (AM; Difco, USA) para la detección de bacterias marinas heterótrofas (BMH), y por otro lado, en placas de Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS; Oxoid, UK), como medio selectivo para la detección de presuntos vibrios (PV). Tanto las placas de AM como las de TCBS se incubaron bajo condiciones aeróbicas a 20°C durante 24-48 h y una semana, respectivamente. Una vez transcurrido este tiempo de incubación, se procedió al conteo de las placas. Las bacterias se contaron como unidades formadoras de colonias por gramo de gónada (UFC g⁻¹) y se expresaron en valores medios para machos y hembras, y como promedio de ambos sexos.

Tanto los huevos, que se recogieron durante el desove, como las posteriores larvas D, se sembraron directamente sobre las placas de AM y TCBS con un asa de siembra (1 μ L), de manera que se pudiera detectar la presencia o ausencia de bacterias obteniendo una estimación semicuantitativa del número de bacterias. En todos los casos, se identificaron diferentes tipos de colonias, tanto en AM como en TCBS, en base a características morfológicas y de crecimiento. Se aisló una colonia de cada uno de los tipos predominantes, se purificó y se mantuvo congelada para futuros estudios, a -80°C en Caldo Marino (CM; Difco, USA), suplementada con glicerol al 20% (v/v). Todos los aislados se analizaron en base a su perfil fenotípico determinado siguiendo las pruebas descritas por Prado *et al.*, (2014b). Únicamente fueron seleccionados aquellos que compartían las principales características fenotípicas descritas para el género *Vibrio* (Noguerola y Blanch, 2008). El ADN genómico de estos aislados se extrajo con InstaGene™ Matrix (Bio-Rad, USA) para amplificar la secuencia parcial del gen ARNr 16S utilizando los cebadores 27F, 1100R y 1510R para obtener una secuencia de aproximadamente 1.400 pb. Estas secuencias fueron analizadas con el software Lasergene Seqman (DNASTar, WI, USA) e identificadas en la base de datos EzTaxon-e (Kim *et al.*, 2012). Los análisis filogenéticos se realizaron empleando el software MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) después de múltiples alineamientos utilizando el algoritmo CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994). Se determinaron las distancias usando

Esquema IV. 1.- Protocolo de procesado de muestras para histología clásica.

Fijación

1. Introducción de las gónadas en fijador Davidson durante 48 h.

Deshidratación

2. Una vez fijados los tejidos gonadales, se deshidratan mediante una serie creciente de baños de alcohol en un procesador automático de tejidos Histolab ZX-100:

1. 1x alcohol de 70º.
2. 1x alcohol de 80º.
3. 3x alcohol de 96º.
4. 2x alcohol de 100º.
5. 1x alcohol de 100º y xileno (1:1).
6. 2x xileno
7. 2x parafina a 60ºC.

Formación de bloques de parafina y realización de cortes histológicos

3. Después de que la muestra haya sido deshidratada, hay que incluirlas en un bloque sólido de parafina que nos permita poder hacer cortes histológicos de 5 µm de grosor en un micrótopo Microm HM340E.

4. Se introducen los cortes en un baño de agua a 40ºC y se montan sobre un portaobjetos empapado en gelatina.

5. Se secan los cortes en una estufa a 40ºC.

Desparafinado e hidratación

6. Para eliminar la parafina sobrante de las muestras e hidratarlas se emplea una serie decreciente de baños en alcohol:

1. 3x xileno.
2. 1x alcohol de 100º.
3. 1x alcohol de 96º.
4. 1x alcohol de 80º.
5. 1x alcohol de 70º.
6. 1x alcohol de 50º.
7. 1x agua destilada.

Preparación de colorantes y tinción de los cortes

7. **Hematoxilina de Harris:**

1. Solución A: Hematoxilina + alcohol de 100º.
2. Solución B: Sulfato de aluminio y potasio + agua destilada.
3. Reposo 24 h.
4. Adición de óxido de mercurio.
5. Ebullición a 100ºC.
6. Enfriado y adición de timol y ácido acético.

8. **Eosina:**

1. Eosina + agua destilada + ácido acético.

9. Para teñir los cortes se sumergen en una serie de baños de los tintes preparados:

1. 1x hematoxilina de Harris.
2. 1x agua corriente en cascada.
3. 1x eosina.
4. 4x alcohol de 100º.
5. 3x xileno.

el modelo de Kimura-2 y para la construcción del árbol filogenético se utilizó el algoritmo Neighbor-Joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) con el método bootstrap de 1.000 réplicas. Las secuencias obtenidas se depositaron en la base de datos DDBJ/EMBL/GenBank bajo los números de acceso HF549200 – HF549247 (Tabla IV. 1; Figs. IV. 2 y 3).

Por último, también se muestrearon el agua de mar y la mezcla de fitoplancton utilizado como alimento a lo largo del acondicionamiento. Las muestras se procesaron “in situ”. Se diluyeron con agua de mar estéril y de cada una de ellas se sembraron 100 µL en TCBS para descartar ambas vías como fuente de vibrios. Los recuentos de PV se expresaron como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL⁻¹).

Análisis estadísticos

Primero se evaluó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk y después se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de las diferencias significativas usando la versión 12 del software STATISTICA (Staf Soft, Inc., USA). La homogeneidad de las varianzas se verificó por medio del test de Barlett. Además, se realizó un análisis de tres vías de la varianza (ANOVA) con el fitoplancton, la temperatura y el sexo como factores, mediante el software STATISTICA. Los datos de BMH y PV se transformaron logarítmicamente para cumplir con los criterios de homogeneidad de varianzas para el análisis ANOVA. Siempre que fue necesario, se aplicaron análisis *post hoc* con el test LSD. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Carga bacteriana de los reproductores

Prueba 1 (mayo – junio 2011)

Lo primero que se observa en las cargas de presuntos vibrios (PV), de los ejemplares empleados como reproductores (Fig. IV. 1A; Tabla IV. 2), antes de ser acondicionados (muestreo T_0), es que fueron similares y no significativos independientemente del sexo ($\approx 10^4$ CFU g⁻¹, $p > 0,05$), mientras que las bacterias marinas heterótrofas (BMH) fueron un logaritmo mayor en hembras que en machos sin que esa diferencia fuera significativa ($p > 0,05$). Los análisis cuantitativos revelaron que los valores de la desviación estándar superaban la media en parte de las muestras debido a las diferencias encontradas en las cargas bacterianas (ver valores máximos y mínimos en la Tabla IV. 3) y en los desarrollos gonadales que las almejas presentaban en el momento de su extracción del medio natural (Tabla IV. 3). Este hecho se observó a lo largo de esta prueba y los valores de EDG siempre estuvieron por encima del estadio 2 (mínimo: 2; máximo: 3) (Tabla IV. 2 y IV. 3). La proporción PV:BMH que se encontró fue de 1:1 en machos y de 1:10 en hembras.

Durante las dos primeras semanas de acondicionamiento (muestreo T_1) (Fig. IV. 1A; Tabla IV. 3) las cargas de PV y de BMH, tanto en machos como en hembras, se redujeron en el acondicionamiento B y más claramente en el acondicionamiento C, en el cual se observó una reducción significativa de dos logaritmos en la carga de PV con respecto a la misma del primer muestreo (muestreo T_0) (Tabla IV. 2, $p < 0,05$). Los PV y BMH de las hembras muestreadas de los tratamientos A y D, fueron significativamente mayor que en los machos ($p < 0,05$). Los análisis cuantitativos también revelaron que, durante estas dos primeras semanas de acondicionamiento (muestreo T_1), se produjo una reducción significativa de un logaritmo en la carga de BMH en los machos del tratamiento C (Tabla IV. 2, $p < 0,05$), y también de un logaritmo en las hembras de los tratamientos B y C (Tabla IV. 3, $p < 0,05$). En este momento de la prueba, el ratio de PV:BMH para los machos fue de 1:10 en los acondicionamientos A, B y C, y de 1:100 para los del acondicionamiento D. En las hembras, este ratio fue más variable, siendo de 1:1 en el acondicionamiento A, de 1:10

en el B, y de 1:100 en los acondicionamientos, a temperatura constante, C y D. Es decir, en la mayoría de los casos el número de PV se redujo con respecto al muestreo inicial (muestreo T_0).

Tabla IV. 1.- Número de acceso de las secuencias obtenidas en este estudio depositadas en el GenBank.

Acondicionamiento				Estadios de transformación			
Prueba 1		Prueba 2		Huevos		Larvas D	
Cepa	Nº acceso	Cepa	Nº acceso	Cepa	Nº acceso	Cepa	Nº acceso
2940	LN867527	3456	LN867560	3614	LN867588	3620	LN867594
2941	LN867528	3457	LN867561	3693	LN867589	3621	LN867595
2937	LN867529	3458	LN867562	3615	LN867590	3618	LN867596
2938	LN867530	3459	LN867563	3611	LN867591	3619	LN867597
2935	LN867531	3460	LN867564	3612	LN867592	3634	LN867598
2936	LN867532	3461	LN867565	3613	LN867593	3685	LN867599
2939	LN867533	3480	LN867566			3684	LN867600
2956	LN867534	3481	LN867567				
3007	LN867535	3482	LN867568				
3029	LN867536	3483	LN867569				
3035	LN867537	3484	LN867570				
3009	LN867538	3486	LN867571				
3012	LN867539	3487	LN867572				
3020	LN867540	3558	LN867573				
3019	LN867541	3560	LN867574				
3014	LN867542	3566	LN867575				
3036	LN867543	3567	LN867576				
3018	LN867544	3568	LN867577				
3017	LN867545	3569	LN867578				
3069	LN867546	3570	LN867579				
3058	LN867547	3556	LN867580				
3082	LN867548	3680	LN867581				
3071	LN867549	3681	LN867582				
3072	LN867550	3682	LN867583				
3073	LN867551	3683	LN867584				
3086	LN867552	3609	LN867585				
3060	LN867553	3610	LN867586				
3062	LN867554	3677	LN867587				
3063	LN867555						
3074	LN867556						
3075	LN867557						
3077	LN867558						
3066	LN867559						

Al cabo de las cuatro semanas de acondicionamiento (muestreo T_2) (Fig. IV. 1A; Tabla IV. 3), la carga de PV en las almejas del acondicionamiento C, decreció significativamente en ambos sexos ($p < 0,05$) comparándolas con las encontradas en el muestreo inicial (muestreo T_0), mientras que en el acondicionamiento D, sólo los machos redujeron su carga de PV, aunque no fue de manera significativa ($p > 0,05$). En ambos casos, la proporción PV:BMH fue de 1:10 para machos y de 1:100 para las

hembras. Además, en todos los tratamientos testados, la carga de BMH fue similar a la que se observó antes de comenzar los acondicionamientos (muestreo T_0) ($\approx 10^4$ - 10^5 UFC g^{-1} para ambos sexos) y no fue significativa ($p > 0,05$) (Tabla IV. 3).

Por último, los EDG se incrementaron significativamente ($p < 0,05$) a lo largo de todos los acondicionamientos en relación al muestreo inicial (T_0) (EDG = 2,3 y 2,5 para hembras y machos, respectivamente; Tabla IV. 3). Los valores máximos del desarrollo gonadal se alcanzaron al final de la prueba (muestreo T_2) en los reproductores acondicionados bajo el tratamiento C (EDG = 4,0 y 3,5 para hembras y machos respectivamente; Tabla IV. 3).

Por otro lado, también se analizaron los efectos que por separado tenían la temperatura y el fitoplancton sobre la carga bacteriana de los reproductores acondicionados. Así, la temperatura constante (acondicionamientos C y D) promovió una reducción significativa de la carga de PV ($p < 0,05$) al final de la prueba (muestreo T_2), en comparación con lo observado en los tratamientos con gradiente de temperatura (acondicionamientos A y B) (Tabla IV. 3). La carga de BMH fue similar en el muestreo T_2 en todos los grupos, independientemente de las condiciones de temperatura ($\approx 10^4 - 10^5$ UFC g^{-1}), aunque fue ligeramente más baja y no significativa ($p > 0,05$) para los acondicionamientos a temperatura constante (Tabla IV. 3).

La influencia del fitoplancton sólo se evaluó en los reproductores de los tratamientos A y C, ya que estos fueron alimentados por primera vez después de dos semanas de depuración (Fig. IV. 1A; Tabla IV. 3). Comparando ambos acondicionamientos, se observó un incremento no significativo ($p > 0,05$) de la carga de PV y BMH en la mayoría de machos y hembras, excepto en las hembras del tratamiento A.

Es interesante señalar, que la carga de PV, tanto en la entrada de agua de mar como en la mezcla de fitoplancton que se empleó como alimento, estuvo por debajo de los límites de detección en todos los casos ($< 10^1$ UFC mL^{-1}).

En resumen, la mayor reducción en PV y BMH se detectó en los reproductores que se habían acondicionado a temperatura constante (C y D), y particularmente el

tratamiento C, el cual, tras las dos primeras semanas sin comer, proporcionó los mejores resultados a nivel microbiológico y a nivel de desarrollo gonadal.

Tabla IV. 2.- Conteos máximos y mínimos (UFC g⁻¹) de PV, BMH y valores de EDG correspondientes al muestreo inicial T₀, tanto de la primera prueba como de la segunda.

	Prueba 1					
	Machos			Hembras		
	PV	BMH	EDG	PV	BMH	EDG
Máximo	6,7x10 ⁴	1,4x10 ⁵	3	2,8x10 ⁴	4,4x10 ⁵	3
Mínimo	<10 ²	<10 ²	2	5,9x10 ³	3,7x10 ⁴	2
	Prueba 2					
	Machos			Hembras		
	PV	BMH	EDG	PV	BMH	EDG
Máximo	3,8x10 ²	6,2x10 ⁴	3	1,9x10 ⁴	2,6x10 ⁶	3
Mínimo	<10 ²	4,8x10 ³	2	1,8x10 ³	1,0x10 ⁴	2

Prueba 2 (mayo – junio 2012)

En esta segunda prueba, se reevaluó el momento óptimo para comenzar la alimentación, es decir el tiempo de depuración de los reproductores acondicionados a temperatura constante (Fig. IV. 1B; Tabla IV. 4). La carga bacteriana de los reproductores en el momento en el que se inició la prueba (muestreo T₀) (Fig. IV. 1B; Tabla IV. 4) fue ligeramente diferente (no significativa; $p > 0,05$), a la misma encontrada en el muestreo T₀ de la prueba 1 (Tablas IV. 2; IV. 3; IV. 4). Las cargas de PV fueron más bajas para ambos sexos, mientras que la carga BMH fue mayor únicamente para las hembras. De hecho, el ratio PV:BMH fue de 1:10 para machos y de 1:100 para hembras. Los valores de desviación estándar y de EDG fueron similares a los encontrados en la primera prueba (Tablas IV. 3; IV. 4).

Tras la primera semana (muestreo T₁) (Fig. IV. 1B; Tabla IV. 4), la carga de los PV decreció en todos los casos significativamente ($p < 0,05$) con respecto al muestreo inicial (T₀). Más concretamente, la carga de PV y BMH fueron significativamente más bajas ($p < 0,05$) en los acondicionamientos C1 y C2, es decir, en aquellos sometidos a depuración (Tabla IV. 4) que en el grupo C0. Cabe destacar que la carga de PV en el acondicionamiento C2 estuvo por debajo de los límites de detección (<10² UFC g⁻¹).

Tabla IV. 3.- Cargas bacterianas (UFC g-1) (presuntos vibrios: PV; bacterias marinas heterótrofas: BMH) y estadio de desarrollo gonadal (EDG) obtenidos en la primera prueba (mayo - junio 2011). Acondicionamiento de reproductores bajo gradiente de temperatura (A y B) y bajo temperatura constante (C y D). Los valores en negrita representan los valores más bajos en carga bacteriana y los más altos en desarrollo gonadal. Los valores para PV, BMH y EDG que no compartan la misma letra superescrita, en diferentes muestreos, son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

		Inicio (T ₀)		Machos	Hembras	Promedio		
			PV	1,2 x 10 ⁴ ± 2,7 x 10 ^{4ab}	1,7 x 10 ⁴ ± 1,0 x 10 ^{4a}	1,4 x 10 ⁴ ± 2,1 x 10 ^{4bc}		
			BMH	3,1 x 10 ⁴ ± 5,3 x 10 ^{4abc}	1,4 x 10 ⁵ ± 2,0 x 10 ^{5ab}	7,6 x 10 ⁴ ± 1,3 x 10 ^{5bc}		
			EDG	2,5 ± 0,5 ^b	2,3 ± 0,5 ^b	2,3 ± 0,4 ^c		
		Gradiente temperatura (+ 0,3°C día ⁻¹)						
		A) sin fitoplancton						
		Machos	Hembras	Promedio	Machos	Hembras	Promedio	
2 Semanas (T ₁)	PV	2,0 x 10 ³ ± 2,0 x 10 ^{3ab}	1,3 x 10 ⁵ ± 2,8 x 10 ^{5ab}	8,0 x 10 ⁴ ± 8,7 x 10 ^{4ab}	2,1 x 10 ³ ± 3,4 x 10 ^{3bc}	1,0 x 10 ³ ± 1,7 x 10 ^{3bcd}	1,5 x 10 ³ ± 2,1 x 10 ^{3cd}	
	BMH	1,2 x 10 ⁴ ± 9,3 x 10 ^{3bcd}	5,5 x 10 ⁵ ± 1,2 x 10 ^{6ab}	3,1 x 10 ⁵ ± 3,6 x 10 ^{5abc}	2,7 x 10 ⁴ ± 2,6 x 10 ^{4abc}	4,6 x 10 ⁴ ± 3,7 x 10 ^{4b}	3,9 x 10 ⁴ ± 3,7 x 10 ^{3bc}	
	EDG	2,8 ± 0,5 ^{ab}	3,2 ± 0,8 ^{ab}	3,0 ± 0,3 ^{bc}	3,2 ± 0,8 ^{ab}	3,5 ± 0,6 ^{ab}	3,0 ± 0,0 ^{bc}	
4 Semanas (T ₂)	PV	1,6 x 10 ⁵ ± 1,6 x 10 ^{5a}	5,9 x 10 ⁴ ± 9,0 x 10 ^{4a}	1,0 x 10 ⁵ ± 1,4 x 10 ^{5a}	2,6 x 10 ⁴ ± 5,8 x 10 ^{4ab}	4,5 x 10 ⁴ ± 5,2 x 10 ^{4a}	3,2 x 10 ⁴ ± 3,3 x 10 ^{4ab}	
	BMH	5,7 x 10 ⁵ ± 4,8 x 10 ^{5a}	3,9 x 10 ⁵ ± 2,9 x 10 ^{5ab}	4,4 x 10 ⁵ ± 3,5 x 10 ^{5a}	1,3 x 10 ⁵ ± 1,5 x 10 ^{5abc}	1,6 x 10 ⁵ ± 1,3 x 10 ^{5ab}	1,4 x 10 ⁵ ± 2,4 x 10 ^{5ab}	
	EDG	3,2 ± 0,8 ^{ab}	3,6 ± 0,5 ^a	3,4 ± 0,3 ^{ab}	3,3 ± 0,5 ^{ab}	3,7 ± 0,6 ^a	3,4 ± 0,3 ^{ab}	
		Temperatura constante (20°C)						
		C) sin fitoplancton						
		Machos	Hembras	Promedio	Machos	Hembras	Promedio	
2 Semanas (T ₁)	PV	1,4 x 10 ² ± 3,1 x 10 ^{2c}	4,5 x 10 ² ± 9,0 x 10 ^{2d}	2,9 x 10 ² ± 5,9 x 10 ^{2d}	1,4 x 10 ³ ± 1,8 x 10 ^{3bc}	2,5 x 10 ⁴ ± 3,9 x 10 ^{4abc}	1,1 x 10 ⁴ ± 2,3 x 10 ^{4bc}	
	BMH	3,5 x 10 ³ ± 4,0 x 10 ^{3d}	1,2 x 10 ⁴ ± 1,1 x 10 ^{4b}	7,7 x 10 ³ ± 1,4 x 10 ^{3c}	3,7 x 10 ⁵ ± 8,0 x 10 ^{5ab}	1,5 x 10 ⁶ ± 1,4 x 10 ^{6a}	8,3 x 10 ⁵ ± 1,8 x 10 ^{5ab}	
	EDG	3,4 x 0,9 ^a	3,6 ± 0,5 ^a	3,5 ± 0,1 ^{ab}	3,2 ± 0,8 ^{ab}	3,8 ± 0,5 ^a	3,4 ± 0,0 ^{ab}	
4 Semanas (T ₂)	PV	1,1 x 10 ³ ± 1,6 x 10 ^{3bc}	9,4 x 10 ² ± 1,1 x 10 ^{3cd}	1,0 x 10 ³ ± 8,2 x 10 ^{2cd}	2,9 x 10 ³ ± 4,5 x 10 ^{3bc}	1,7 x 10 ⁴ ± 2,7 x 10 ^{4ab}	1,0 x 10 ⁴ ± 5,3 x 10 ^{3bc}	
	BMH	1,5 x 10 ⁴ ± 1,7 x 10 ^{4bcd}	1,8 x 10 ⁵ ± 2,6 x 10 ^{5ab}	7,1 x 10 ⁴ ± 9,8 x 10 ^{4c}	6,6 x 10 ⁴ ± 7,3 x 10 ^{4abc}	8,6 x 10 ⁴ ± 5,8 x 10 ^{4ab}	7,5 x 10 ⁴ ± 1,9 x 10 ^{4ab}	
	EDG	3,5 ± 0,8 ^a	4,0 ± 0,0 ^a	3,7 ± 0,1 ^a	3,2 ± 0,4 ^{ab}	3,0 ± 0,7 ^{ab}	3,1 ± 0,4 ^{ab}	

Los reproductores del grupo C0 (no depurado), el cual fue alimentado desde el comienzo de la prueba, mostraron los valores más altos de PV y BMH, estando el ratio de PV:BMH en 1:1000 para machos y en 1:100 para las hembras.

Como era de esperar, el fitoplancton tuvo un efecto similar en la carga bacteriana al que se observó en la primera prueba. De ahí que en los machos y las hembras del acondicionamiento C1 (Fig. IV. 1B; Tabla IV. 4), la carga de PV y BMH incrementara significativamente ($p < 0,05$) a partir del momento en que se les alimentó, es decir, después de la primera semana de depuración (muestreo T_2). Al contrario, las cargas de PV de los reproductores que no se habían alimentado hasta ese momento (grupo C2), se mantuvieron por debajo de los límites de detección ($<10^2$ UFC g^{-1}). Además, en todas las muestras tomadas, las cargas de BMH permanecieron en el orden de $10^4 - 10^5$ UFC g^{-1} , independientemente del tipo de acondicionamiento al que estuviesen sometidos (Tabla IV. 4).

En el muestreo final (T_3) (Fig. IV. 1B; Tabla IV. 4), la carga de PV de todos los grupos, fue más baja que en el muestreo inicial (T_0), aunque estos resultados no fueron significativos ($p > 0,05$). Muy interesante resultó que los valores de PV de los acondicionamientos C1 y C2 estuviesen por debajo de los límites de detección ($<10^2$ UFC g^{-1}). Mientras que los valores de BMH fueron similares ($\approx 10^3 - 10^4$ UFC g^{-1}) y no significativos ($p > 0,05$) en todos los grupos de acondicionamiento (Tabla IV. 4). También fue destacable que la presencia de fitoplancton sólo influyó en la carga de PV de los machos del acondicionamiento C2, pero no en las hembras. Como se observó también en la prueba 1, la carga de PV del agua de entrada y de la mezcla de fitoplancton empleada como alimento, siempre estuvo por debajo de los límites de detección ($<10^1$ UFC mL^{-1}). Además, el EDG se incrementó a lo largo del estudio, alcanzando los mayores valores para las hembras del acondicionamiento C2 y para los machos de los grupos C0, C1 y C2 (Tabla IV. 4).

Tabla IV. 4.- Cargas bacterianas (UFC g-1) (presuntos vibrios: PV; bacterias marinas heterótrofas: BMH) y estadio de desarrollo gonadal (EDG) obtenidos en la segunda prueba (mayo - junio 2012). Acondicionamiento de reproductores a temperatura constante (20°C) en los que se ensayan diferentes periodos de depuración (C0, C1 y C2). Los valores en negrita representan los valores más bajos en carga bacteriana y los más altos en desarrollo gonadal.

Temperatura constante (20°C)									
C0) con fitoplancton desde el comienzo									
C1) con fitoplancton después semana 1									
C2) con fitoplancton después semana 2									
		Inicio (T ₀)		Machos		Hembras		Promedio	
1Semana (T ₁)		PV	8,7 x 10 ² ± 1,8 x 10 ^{3ab}	1,2 x 10 ³ ± 9,7 x 10 ^{2b}	1,5 x 10 ² ± 3,6 x 10 ^{2ab}	<10 ^{2c}	6,7 x 10 ⁴ ± 1,3 x 10 ^{5ab}	1,5 x 10 ⁴ ± 1,7 x 10 ^{4abc}	<10 ^{2c}
		BMH	1,6 x 10 ² ± 2,6 x 10 ^{5ab}	7,0 x 10 ⁵ ± 1,1 x 10 ^{6ab}	3,1 x 10 ⁵ ± 5,9 x 10 ^{5abc}	1,0 x 10 ⁵ ± 2,0 x 10 ^{5bc}	2,2 x 10 ⁵ ± 4,9 x 10 ^{5a}	4,6 x 10 ⁵ ± 7,1 x 10 ^{4c}	3,1 x 10 ⁴ ± 3,7 x 10 ^{4ab}
		EDG	3,2 ± 0,4 ^{de}	3,3 ± 0,4 ^{cd}	3,6 ± 0,5^{bcdde}	3,0 ± 0,6 ^{bc}	3,4 ± 0,6 ^{abcd}	3,2 ± 0,4 ^{dde}	2,9 ± 0,7 ^{cd}
2 Semanas (T ₂)		PV	3,1 x 10 ³ ± 2,1 x 10 ^{4a}	2,1 x 10 ⁴ ± 1,4 x 10 ^{3a}	5,0 x 10 ⁴ ± 1,1 x 10 ^{3a}	1,2 x 10 ³ ± 2,2 x 10 ^{3bc}	2,1 x 10 ⁵ ± 3,0 x 10 ^{4a}	<10 ^{2c}	<10 ^{2c}
		BMH	8,7 x 10 ⁴ ± 8,4 x 10 ^{4abc}	2,9 x 10 ⁵ ± 2,8 x 10 ^{5abc}	3,8 x 10 ⁵ ± 8,2 x 10 ^{5a}	1,1 x 10 ⁵ ± 1,5 x 10 ^{5bc}	2,2 x 10 ⁵ ± 4,9 x 10 ^{5a}	1,4 x 10⁴ ± 1,7 x 10^{4abc}	6,1 x 10 ⁴ ± 7,7 x 10 ^{4ab}
		EDG	3,8 ± 0,5 ^{ab}	3,5 ± 0,5^b	4,0 ± 0,0^{ab}	3,3 ± 0,5 ^{abc}	3,6 ± 0,5 ^{abc}	3,7 ± 0,5 ^{abcd}	3,4 ± 0,5 ^{ab}
4 Semanas (T ₃)		PV	1,4 x 10 ² ± 3,5 x 10 ^{2ab}	2,8 x 10 ² ± 4,4 x 10 ^{2bc}	<10 ^{2b}	<10 ^{2c}	<10 ^{2c}	1,1 x 10 ² ± 1,9 x 10 ^{2ab}	<10 ^{2c}
		BMH	4,0 x 10 ² ± 3,0 x 10 ^{3bc}	2,3 x 10 ⁴ ± 3,2 x 10 ^{4c}	1,1 x 10³ ± 5,9 x 10^{2c}	4,4 x 10 ² ± 3,4 x 10 ^{3c}	2,7 x 10 ³ ± 2,8 x 10 ^{3b}	3,7 x 10 ³ ± 2,6 x 10 ^{3bc}	3,6 x 10 ³ ± 2,2 x 10 ^{3ab}
		EDG	4,0 ± 0,0 ^{ab}	3,8 ± 0,4 ^a	4,0 ± 0,0^{ab}	3,7 ± 0,5 ^a	3,9 ± 0,4 ^a	4,0 ± 0,0^a	4,0 ± 0,0 ^a

En resumen, los resultados confirmaron que las almejas acondicionadas bajo el protocolo C (= C2), es decir a 20°C durante cuatro semanas, las dos primeras sin alimentación (proceso de depuración), y las dos siguientes alimentadas, obtuvieron los mejores resultados de desarrollo gonadal y una reducción considerable en las cargas de PV y BMH. Además de ser la propuesta más económica, ya que se reducen los costes que supone la alimentación durante parte del acondicionamiento.

Cambios en la población de *Vibrio* spp. de los reproductores acondicionados

Durante todos los acondicionamientos probados, se hicieron análisis cualitativos de los vibrios asociados a la gónada de los reproductores. Un total de 164 cepas se aislaron en las muestras sembradas tanto en AM como en TCBS: 68 en la primera prueba y 96 en la segunda. De estos, 61 aislados presentaron un perfil fenotípico común a la gran mayoría de las especies del género *Vibrio* (33 aislados del primer ensayo y 28 del segundo): bacterias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, crecimiento en TCBS, reducción de nitratos en nitritos, actividad catalasa, oxidasas, producción de indol y crecimiento a 4-25 °C y 3-6% NaCl (datos no mostrados). La secuenciación del gen ARNr 16S (Tabla IV. 5) permitió confirmar que la mayoría de estos aislados (56 de los 61) pertenecieron a dicho género bacteriano. Los 5 aislados restantes fueron asignados a otros grupos taxónomicos, concretamente *Photobacterium* (n = 3) y *Pseudovibrio* (n = 2).

Prueba 1 (mayo – junio 2011)

Como se puede observar en la tabla IV. 5A, los aislados identificados como miembros del clado Splendidus (Fig. IV. 2 y Tabla IV. 5A), tales como *V. atlanticus*/*V. tasmaniensis*, *V. hemicentroti* y principalmente *V. gigantis*/*V. celticus*, fueron los más comunes en las gónadas de los reproductores en el momento en el que se extrajeron del banco natural (T₀). Estas colonias fueron los tipos predominantes en las placas correspondientes a dicho muestreo inicial. Puntualmente, se aislaron miembros del clado Harveyi, concretamente *V. jasicida*.

Durante el muestreo T₁, es decir después de llevar dos semanas de acondicionamiento, se aislaron cepas relacionadas con el patógeno de larvas de bivalvos *V. tubiashii* (Fig. IV. 3 y Tabla IV. 5A) en todas las muestras, independientemente del

tipo de acondicionamiento que se tratase. Sin embargo, en el acondicionamiento C esta especie no fue predominante en la muestra. Además, en los lotes de reproductores acondicionados durante las dos primeras semanas sin alimento (A y C) se identificaron aislados de otros géneros como *Photobacterium* o *Pseudovibrio*.

El efecto de estos diferentes acondicionamientos sobre la diversidad de vibrios, se observó principalmente al final de la prueba (muestreo T₂). En este momento, el efecto de la temperatura, bien constante o gradual, favoreció la presencia de los distintos clados de vibrios, ya que todos los reproductores analizados se mantuvieron alimentados durante estas dos últimas semanas. De esta manera, el clado Splendidus (Fig. IV. 2), representado concretamente por las especies *V. gigantis/V. celticus*, predominó en la gónada de los reproductores acondicionados previamente con gradiente de temperatura (A y B) (Tabla IV. 5A). Por otro lado, los aislados pertenecientes al clado Harveyi, como *V. neocaledonicus*, y particularmente aquellos identificados como miembros del clado Mediterranei, como *V. thalassae* o *V. mediterranei*, (Fig. IV. 3), se detectaron en los reproductores estabulados a temperatura constante desde el comienzo del acondicionamiento (C y D) (Tabla IV. 5A).

Prueba 2 (mayo – junio 2012)

En esta prueba, donde los acondicionamientos C0 y C2 eran equivalentes a los D y C de la primera prueba respectivamente, se observó que la evolución cualitativa de los distintos vibrios fue similar a la encontrada en la anterior prueba. El clado Splendidus (Fig. IV. 2 y Tabla IV. 5B) fue otra vez el grupo predominante de vibrios en las almejas en el momento en que se estabularon en el criadero (muestreo T₀). Como era de esperar, en los grupos con temperatura constante, la detección de este clado se redujo a lo largo del acondicionamiento (Tabla IV. 5B). Igual que en la primera experiencia los clados Mediterranei (que incluye a *V. thalassae* y *V. mediterranei*) y Harveyi (que incluye a *V. neocaledonicus*, *V. owensii* y *V. jasicida*) (Fig. IV. 3 y Tabla IV. 5B), ganaron importancia al final de estos acondicionamientos (muestreo T₃). Como reseña interesante, se identificó un aislado como el patógeno larvario *V. europaeus* (Fig. IV. 3 y Tabla IV. 5B) en el acondicionamiento C0 (muestreo T₃). En algunos casos (n=10), el porcentaje de similitud obtenido mediante la secuenciación del gen ARNr 16S estuvo por debajo de los límites propuestos para su asignación a nivel de especie (<98,8%).

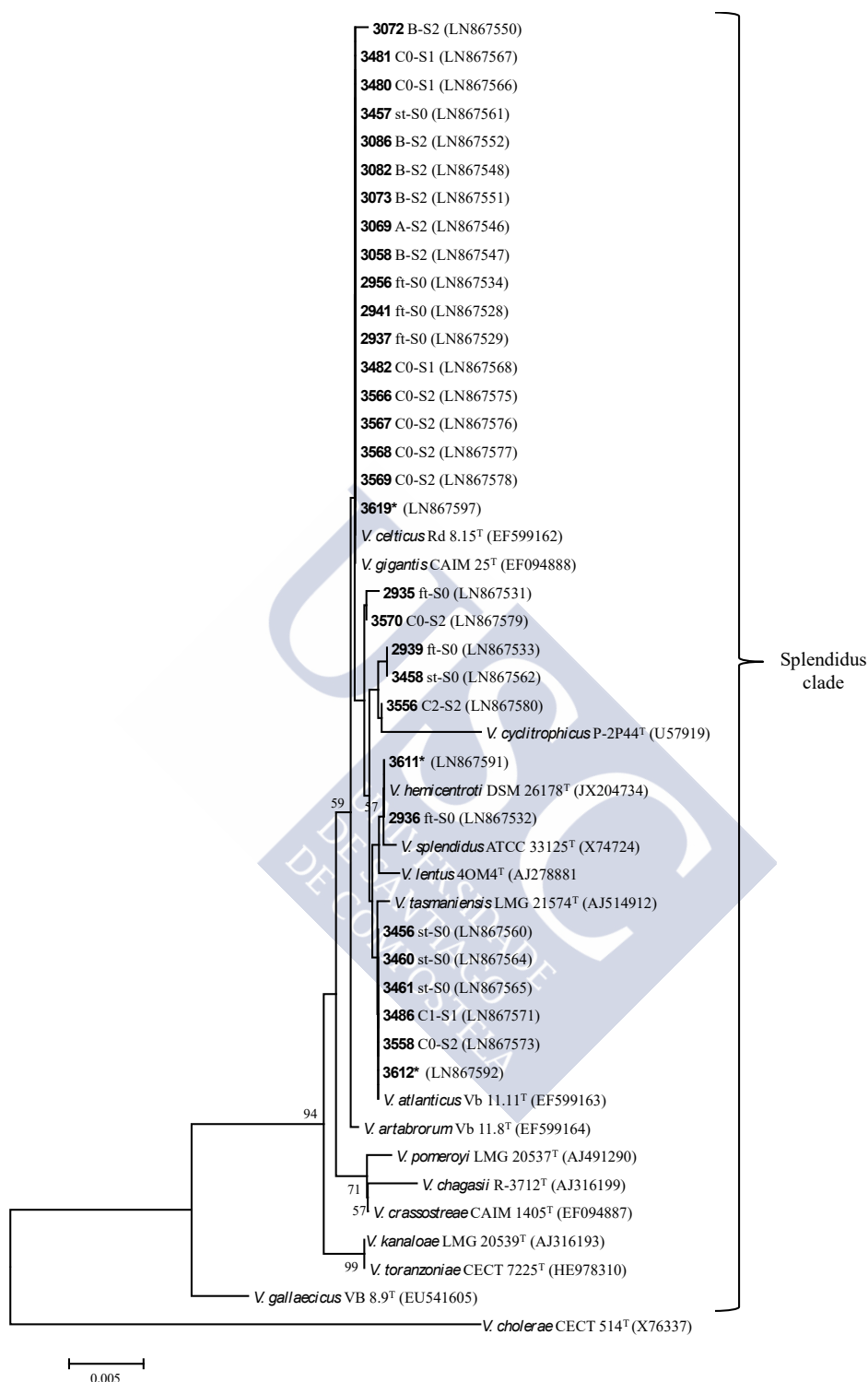


Figura IV. 2.- Árbol filogenético basado en las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas incluidas en el clado Splendidus, construido usando el algoritmo NJ. Se empleó *Vibrio cholerae* CECT 514^T como "outgroup". La prueba (ft: prueba 1, st: prueba 2), el acondicionamiento (A, B, C, D, C0, C1 y C2) y el muestreo (S1, S2 y S3) se indican antes de los números de acceso. Las cepas aisladas después del desove se muestran con un *. Los números de acceso de las secuencias en el GenBank se muestran entre paréntesis. La estabilidad del agrupamiento se estimó mediante valores de "bootstrap" de 1000 réplicas. Barra: 0,005 sustituciones por posición de nucleótido.



Inducción a la puesta, obtención de gametos y transformación a larva D

Se indujo el desove de los reproductores correspondientes a los grupos C0 y C2 (Tabla IV. 5C) para establecer la relación entre los acondicionamientos a temperatura constante y las tasas de transformación. En el grupo C2 (= acondicionamiento C), el 33,7% de los huevos obtenidos en la puesta se transformó exitosamente a larva D. Mientras que, sólo el 10,5% de los huevos del acondicionamiento C0 consiguieron desarrollarse a larva D.

El efecto de la microbiota de los reproductores se pudo relacionar en este punto con los huevos y las larvas a través de la transmisión vertical bacteriana, de hecho, aislados del clado Harveyi, previamente identificados en los progenitores como *V. neocaledonicus* al final de la segunda prueba (cepa 3638) (Tabla IV. 5B, Muestreo T₃), se detectaron posteriormente en los huevos y las larvas D (cepa 3693) (Tabla IV. 5C y Fig. IV. 3). Es decir, los resultados sugieren la transmisión del patógeno larvario *V. europaeus*, puesto que esta cepa se aisló tanto en los reproductores del acondicionamiento C0 como en los huevos obtenidos tras su desove (cepas 3610 y 3614) (Tabla IV. 5 y Fig. IV. 3).

DISCUSIÓN

El conocimiento de la microbiota asociada a los reproductores durante su acondicionamiento en criadero, es esencial para reducir el riesgo de vibriosis en los cultivos larvarios mediante transmisión vertical bacteriana. Otras fuentes importantes de bacterias en el criadero, tales como el agua de mar o las microalgas, se pueden controlar empleando protocolos que garanticen su calidad microbiológica evitando así el riesgo de transferencia de patógenos potenciales a los cultivos larvarios y/o a los reproductores acondicionados (Dubert *et al.*, 2016a; Prado *et al.*, 2014b). Sin embargo, los progenitores que se estabulan en un criadero para su acondicionamiento, son una fuente de bacterias específicas para cada lote larvario debido a la estrecha relación que se manifiesta mediante la transmisión de bacterias desde los progenitores a las larvas (Prado *et al.*, 2014b; Riquelme *et al.*, 1995; Sainz-Hernández y Maeda-Martínez, 2005; Sandaa *et al.*, 2008; Schulze *et al.*, 2006). La gran cantidad de reservas nutricionales que se acumulan en la gónada, promueve la acumulación bacteriana incluyendo vibrios en la gónada de los progenitores (Lodeiros *et al.*, 1987; Prado *et al.*, 2014b; Riquelme *et al.*, 1995; Sainz-Hernández y Maeda-Martínez, 2005; Sugumar *et al.*, 1998).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que, períodos cortos de acondicionamiento con unas condiciones concretas de temperatura y disponibilidad de alimento, constituyen una alternativa eficaz para aclimatar los reproductores con la gametogénesis iniciada y así, alcanzar la maduración sexual, reduciendo considerablemente la carga de vibrios detectada en este órgano con respecto a la concentración que estos presentan a su llegada al criadero. Además, resultó interesante la variabilidad que se observó en la carga bacteriana de los reproductores inmediatamente después de haber sido recolectados en el medio natural, sugiriendo que el proceso de acondicionamiento es multifactorial. En los análisis de las muestras se observaron algunas diferencias entre sexos, sin que se pudiera establecer una relación directa entre el sexo y la carga bacteriana. En contraste con otros autores que detectaron mayores cargas bacterianas en hembras que en machos debido a que las reservas

Tabla IV. 5.- Identificación de los presuntos vibrios (PV) aislados a lo largo del estudio: Prueba I (A), prueba II (B) y de los huevos y larvas D obtenidas de los reproductores acondicionados en los grupos C0 y C2 (C).

A)		1 Semana (T ₁)		2 Semanas (T ₂)		4 Semanas (T ₃)	
Inicio (T ₀)	Acondicionamiento	Identidad (%) ^b	Identidad (%) ^b	Acondicionamiento	Cepa ^a	Identidad (%) ^b	Identidad (%) ^b
Cepa ^a							
2940 ⁽⁺⁾	A	V. <i>jas</i> (99,6)	Ph. <i>aes</i> (96,6)	A	3069	V. <i>gig/V. cel</i> (99,9)	
2941		V. <i>gig/V. cel</i> (100)	Ph. <i>aes</i> (96,5)	B	3058	V. <i>gig/V. cel</i> (99,8)	
2937 ⁽⁺⁾		V. <i>gig/V. cel</i> (99,7)	Pv. <i>asc</i> (100)		3082	V. <i>gig/V. cel</i> (100)	
2938		V. <i>inh</i> (99,6)	V. <i>tub1</i> (99,2)		3071	V. <i>tha</i> (98,8)	
2935 ⁽⁺⁾		V. <i>atl</i> (99,8)	V. <i>tub1</i> (99,2)		3072	V. <i>gig/V. cel</i> (99,9)	
2936	B	V. <i>hem</i> (99,9)	V. <i>tub1</i> (99,2)		3073	V. <i>gig/V. cel</i> (99,9)	
2939 ⁽⁺⁾		V. <i>atl/V. tas</i> (99,7)	V. <i>tub1</i> (99,3)		3086 ⁽⁺⁾	V. <i>gig/V. cel</i> (100)	
2956 ⁽⁺⁾	C	V. <i>gig/V. cel</i> (100)	V. <i>tub1</i> (99,4)	C	3060 ⁽⁺⁾	V. <i>tha</i> (98,8)	
			Pv. <i>asc</i> (99,7)		3062	V. <i>tha</i> (98,8)	
			V. <i>tub1</i> (99,5)		3063 ⁽⁺⁾	V. <i>tha</i> (98,7)	
	D		V. <i>tub1</i> (99,2)	D	3074 ⁽⁺⁾	V. <i>med</i> (99,4)	
					3075	V. <i>neo</i> (99,9)	
					3077 ⁽⁺⁾	V. <i>med</i> (99,4)	
					3066	V. <i>med</i> (99,6)	
B)		1 Semana (T ₁)		2 Semanas (T ₂)		4 Semanas (T ₃)	
Cepa ^a							
3456 ⁽⁺⁾	C0	V. <i>atl</i> (100)	V. <i>gig/V. cel</i> (100)	C0	3558	V. <i>atl</i> (100)	V. <i>jas/V. owe</i> (99,8)
3457		V. <i>gig/V. cel</i> (100)	V. <i>gig/V. cel</i> (100)		3560	V. <i>med</i> (99,8)	V. <i>med</i> (99,8)
3458		V. <i>atl/V. tas</i> (99,8)	V. <i>gig/V. cel</i> (100)		3566 ⁽⁺⁾	V. <i>gig/V. cel</i> (100)	V. <i>tha</i> (98,7)
3459		Ph. <i>aes</i> (96,9)	V. <i>med</i> (99,8)		3567	V. <i>gig/V. cel</i> (100)	V. <i>neo</i> (99,8)
3460	C1	V. <i>atl</i> (100)	V. <i>med</i> (99,8)		3568 ⁽⁺⁾	V. <i>gig/V. cel</i> (100)	V. <i>tha</i> (98,9)
3461 ⁽⁺⁾		V. <i>atl</i> (100)	V. <i>tas</i> (99,9)		3569	V. <i>gig/V. cel</i> (100)	V. <i>tub2</i> (100)
			V. <i>neo</i> (99,9)	C2	3570	V. <i>atl/V. tas</i> (99,8)	V. <i>neo</i> (99,8)
					3556	V. <i>atl/V. tas</i> (99,6)	
C)		Larvas-D		Acondicionamiento			
Huevos		Cepa		Identidad (%) ^b			
		Acondicionamiento		Cepa			
		C0		V. <i>neo</i> (100)			
				C2			
				V. <i>alg</i> (98,2)			
				V. <i>gig/V. cel</i> (99,9)			
				V. <i>neo</i> (100)			
				V. <i>neo</i> (99,9)			
				V. <i>alg</i> (98,2)			

nutricionales en la gónada de las hembras promovían la proliferación bacteriana (Riquelme *et al.*, 1995; Sainz-Hernández y Maeda-Martínez, 2005; Sugumar *et al.*, 1998).

Factores exógenos como la temperatura y la disponibilidad de alimento son determinantes durante el acondicionamiento de los reproductores debido a su impacto sobre la actividad reproductiva; de hecho, algunos autores han demostrado los efectos beneficiosos que estos factores tienen sobre el desarrollo gametogénico durante el proceso de acondicionamiento, por ejemplo, acondicionamientos a 20°C con gradiente de temperatura y/o con alimentación basada en una mezcla de especies microalgales (*Isochrysis* sp. clon T-iso + *Diacronema lutheri* + *Skeletonema costatum* + *Chaetoceros calcitrans* + *Tetraselmis suecica*) (da Costa *et al.*, 2012; Matias *et al.*, 2009; Ojea *et al.*, 2008). Desde un punto de vista microbiológico, Riquelme *et al.* (1995) demostraron, en *Argopecten purpuratus*, que un acondicionamiento adecuado de los reproductores podía reducir el riesgo de transmisión vertical de vibrios. Más tarde, Holbach *et al.* (2015) consiguieron reducir la carga de vibrios en los ovocitos y en las larvas D tras un acondicionamiento de reproductores de *Pecten maximus* durante 2 meses sin arena y con un tratamiento de eritromicina durante 6 días. Algunas medidas profilácticas, que se emplean de manera rutinaria en los criaderos de moluscos bivalvos, son limpiar y cepillar los reproductores a su llegada a las instalaciones, así como el uso de antibióticos (por ejemplo eritromicina, florfenicol, oxitetraciclina o cloranfenicol) para reducir su carga bacteriana, particularmente vibrios, como paso previo a la inducción del desove (Dubert *et al.*, 2016b; Holbach *et al.*, 2015; Miranda *et al.*, 2013; Uriarte *et al.*, 2001). El protocolo propuesto en este trabajo para el acondicionamiento de reproductores de almeja fina, es una buena alternativa al uso de antibióticos, cuya administración causa un gasto adicional, no garantiza el éxito en el cultivo y promueve el rápido desarrollo de vibrios resistentes en los tanques larvarios, con el consecuente riesgo de la aparición y persistencia de enfermedades que no se pueden tratar de forma eficiente (McPhearson *et al.*, 1991).

El análisis individual de los factores exógenos permitió evaluar el efecto de la temperatura y el fitoplancton sobre la carga bacteriana de los reproductores. Los resultados cuantitativos mostraron una reducción significativa de la carga de vibrios en los grupos con temperatura constante. Los cambios en la temperatura del agua de mar se

han identificado como una de las variables más importante que afectan sobre la abundancia de vibrios (Huq *et al.*, 2005; Louis *et al.*, 2003; Romalde *et al.*, 2014; Turner *et al.*, 2009). Diferentes especies de *Vibrio* se ven favorecidas por las condiciones medioambientales tales como la temperatura, la salinidad y/o la disponibilidad de alimento (Armada *et al.*, 2003; Dubert *et al.*, 2016a; Eiler *et al.*, 2006; Takemura *et al.*, 2014). En nuestro estudio se observa que la temperatura gradual promovió, al final de los ensayos, la proliferación de los aislados pertenecientes al clado Splendidus, mientras que la temperatura constante favoreció la presencia de bacterias pertenecientes a los clados Mediterranei y Harveyi. En esta misma línea, otros estudios (Arias *et al.*, 1999; Pujalte *et al.*, 1999) mostraron la influencia de la temperatura sobre estos clados en moluscos bivalvos procedentes de los bancos naturales. Estos autores verificaron la predominancia y estabilidad de *V. splendidus* a temperaturas por debajo de los 20°C y de *V. harveyi* y *V. mediterranei* a temperaturas iguales o superiores a 20°C.

La mayoría de los reproductores depurados (acondicionamientos A, C, C1 y C2) incrementaron sus cargas bacterianas en el momento en el que se les comenzó a alimentar tras la depuración, a pesar de que la carga de presuntos vibrios en la mezcla de fitoplancton estuvo por debajo de los límites de detección. Diferentes autores han constatado la presencia de niveles altos y constantes de bacterias marinas heterótrofas asociados a los cultivos de fitoplancton ($\approx 10^6$ UFC mL⁻¹) (Dubert *et al.*, 2016a; Makridis *et al.*, 2012; Nicolas *et al.*, 2004; Salvensen *et al.*, 2000). El fitoplancton alberga una gran variedad de poblaciones bacterianas que utilizan los metabolitos y las sustancias orgánicas liberadas por las células algales, vivas o muertas (Bruckner *et al.*, 2011; Eiler *et al.*, 2007; Riquelme *et al.*, 1987). Dubert *et al.* (2016a) demostraron que los vibrios, aunque presentes en algunos casos, nunca fueron los principales componentes de las poblaciones bacterianas en el cultivo de una mezcla de fitoplancton compuesto por las especies *Isochrysis* sp., *Diacronema* sp., *Chaetoceros* sp. y *Tetraselmis* sp. Este hecho podría ser la causa del incremento de la carga de vibrios en los reproductores una vez se les comenzó a alimentar, ya que los bivalvos, debido a su naturaleza filtradora, acumulan gran número de bacterias, representando un importante nicho ecológico para vibrios, los cuales son un componente común de su microbiota (Pruzzo *et al.*, 2005).

Desde un punto de vista taxonómico, el gen ARNt 16S tiene una resolución interespecífica limitada para diferenciar la especies del género *Vibrio*, sin embargo puede resultar muy útil para identificar los distintos clados bacterianos (Dubert *et al.*, 2016a). El análisis cualitativo de la población de vibrios nos permitió demostrar que aislados del clado Splendidus fueron los dominantes en los reproductores a su llegada al criadero tras su recolección en el medio natural. Este clado incluye especies predominantes en los sedimentos de las costas marinas, en el agua de mar y en los bivalvos, incluido *R. decussatus* (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2008; Romalde *et al.*, 2014). La detección de los clados Splendidus y Harveyi, a lo largo de los acondicionamientos, se debería tener en cuenta porque éstos incluyen patógenos comunes en la acuicultura como son *V. splendidus*; *V. harveyi*; *V. alginolyticus* o *V. owensii* (Austin, 2010; Cano-Gómez *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2015). También resultó interesante el aislamiento de *V. europaeus* en los reproductores. La patogenicidad de esta especie ha sido demostrada en larvas y juveniles, pero no en especímenes adultos (Elston *et al.*, 2008; Hada *et al.*, 1984; Prado *et al.*, 2014a; Travers *et al.*, 2014). Esto demuestra que los reproductores pueden incluir especies inofensivas para los adultos, pero con potencial patogénico para las larva. Este hecho cobra especial relevancia ya que, en el presente trabajo, se ha demostrado una transmisión vertical de distintas especies de vibrios, desde los reproductores hasta los huevos y larvas D. Cabe destacar que se descarta el fitoplancton como fuente bacteriana ya que durante la incubación de esos huevos no se suministra alimento alguno.

Nuestros resultados, conforme a lo citado anteriormente, demuestran la utilidad y efectividad de los períodos cortos de acondicionamiento en reproductores de almeja fina, desde un punto de vista microbiológico, fisiológico y económico. De esta manera, se consiguió una reducción significativa en la concentración de vibrios asociados a la gónada de los reproductores, cuando éstos se acondicionaron a 20°C durante cuatro semanas, con una depuración inicial de dos semanas y alimentándolos únicamente durante las dos semanas restantes, previas a la inducción de la puesta. La puesta en práctica de este tipo de acondicionamiento en los criaderos puede mejorar la gestión de los reproductores de *R. decussatus*, ya que no implica el uso de antibióticos, y representa una metodología nueva, barata, “eco-friendly” e inocua con el medio y de fácil aplicación en los criaderos de bivalvos.





Conclusiones





Embriología y desarrollo larvario

1. La diferenciación de la glándula de la concha en *R. decussatus* tiene lugar en el estadio de gástrula temprana, antes de que se complete la formación de la prototroca, y como otras especies de venéridos, sigue el modelo o teoría propuesto por Mouëza *et al.* (2006).

2. La secreción de la prodisoconcha en las larvas de *R. decussatus* comienza durante la transición de trocófora a larva D. Y es en el estadio de larva D tardía cuando ya aparece totalmente calcificada.

3. En *R. decussatus*, el penacho apical está presente desde el estadio de trocófora hasta el de pediveliger, y aparece como una estructura permanente durante el desarrollo larvario hasta la metamorfosis a postlarva, momento en el que será reabsorbido junto al velo.

Alimentación larvaria

4. Las larvas de *Ruditapes decussatus* alimentadas con dietas que contienen *Chaetoceros muelleri* presentan mejores resultados en cuanto a crecimiento y supervivencia, que aquellas que no comieron esta especie de diatomea.

5. La presencia de *C. muelleri* en la dieta promueve la acumulación de altos niveles de EPA y de ARA, tanto en los lípidos neutros como en los polares de las larvas de *R. decussatus*. La relación positiva que existe entre estos ácidos grasos esenciales y los mejores resultados obtenidos en cuanto a crecimiento y supervivencia, sugiere la importancia de los mismos en el desarrollo larvario de esta especie.

6. Existe una relación inversa entre el contenido en DPA, tanto de la dieta como de los lípidos neutros de las larvas de *R. decussatus* y el crecimiento de las mismas.

7. Como en otras especies de bivalvos, el ácido dimetil-acetal más importante cuantitativamente es el 18:0dma, y su presencia y acumulación en los lípidos

polares de las larvas de *R. decussatus*, independientemente de la dieta con la que hayan alimentado, se relaciona positivamente con el crecimiento.

8. En las larvas de *R. decussatus*, los ácidos grasos no metilen interrumpidos (NMIDs) se incrementan cuando ciertos PUFAs son deficientes. Además, existe una correlación positiva entre el 22:2NMID, acumulado en los lípidos polares de las larvas, y el crecimiento y la supervivencia.

9. Las deficiencias de DHA en la dieta no tuvieron efectos perjudiciales sobre el desarrollo de las larvas, ya que éstas fueron capaces de modular la composición de la membrana mediante el aumento, en los lípidos polares, de la proporción de EPA, 18:0dma, 22:5(n-3) y 22:2NMID.

Microbiología asociada al acondicionamiento

10. Períodos cortos de acondicionamiento, con unas condiciones concretas de temperatura y disponibilidad de alimento, constituyen una alternativa eficaz para aclimatar los reproductores con la gametogénesis iniciada y así, alcanzar la maduración sexual, reduciendo considerablemente la carga de vibrios.

11. La temperatura gradual durante el acondicionamiento promueve la proliferación de los aislados pertenecientes al clado Splendidus, mientras que la temperatura constante favorece la presencia de bacterias pertenecientes a los clados Mediterranei y Harveyi.

12. Al igual que otras especies de moluscos bivalvos, queda demostrado que en *R. decussatus* existe transmisión vertical de distintas especies de vibrios, desde los reproductores hasta los huevos y posteriores larvas.

13. La puesta en práctica de este protocolo de acondicionamiento es una herramienta útil y efectiva, desde un punto de vista microbiológico, fisiológico y económico, para mejorar la gestión de los reproductores de *R. decussatus* en un criadero, ya que no implica el uso de antibióticos, y representa una metodología nueva,

barata, “*eco-friendly*” e inocua con el medio y de fácil aplicación en los criaderos de bivalvos.





Bibliografía





ALBENTOSA, M.; PÉREZ-CAMACHO, A.; LABARTA, U. y FERNÁNDEZ-REIRIZ, M.J. 1996. Evaluation of live microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. *Aquaculture*, 148 (1): 11-23.

ALBENTOSA, M.; PÉREZ-CAMACHO, A.; LABARTA, U. y FERNÁNDEZ-REIRIZ, M.J. 1997. Evaluation of freeze-dried microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. *Aquaculture*, 154 (3-4): 305-321.

ALLAM, B. y FORD, S. E. 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following in vitro challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 20 (3): 374-383.

ALLAM, B.; PAILLARD, C.; AUFFRET, M. y FORD, S. E. 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: II. Cellular and biochemical changes following in vivo challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 20 (3): 384-397.

ALLEN, J.A. 2011. On the functional morphology of *Pinna* and *Atrina* larvae (Bivalvia: Pinnidae) from the Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 91 (4): 823-829.

ANGUIANO, G. A.; AMADOR, A.; MORENO-LEGORRETA, M.; ARCOS-ORTEGA, F. y VAZQUEZ-BOUCARD, C. 2010. Effects of Exposure to Oxamyl, Carbofuran, Dichlorvos, and Lindane on Acetylcholinesterase Activity in the Gills of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Environmental Toxicology*, 25 (4): 327-332.

ARANDA-BURGOS, J.A. 2010. Desarrollo embrionario y larvario de la almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758): Estudio al microscopio óptico y electrónico de barrido. *Trabajo Fin de Máster*, Universidad de Santiago de Compostela. 26 p.

ARANDA-BURGOS, J.A.; LOUZÁN-PÉREZ, A.; DA COSTA, F.; CERVIÑO-OTERO, A.; NÓVOA-VÁZQUEZ, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ-PATÍÑO, D. 2009a. Desarrollo embrionario y larvario de dos especies de moluscos bivalvos: *Donax trunculus* y *Ruditapes decussatus*. En: D. Beaz, M. Villaroel y S.

- Cárdenas (ed). *XII Congreso Nacional de Acuicultura*, 516-517. Madrid, España.
- ARANDA-BURGOS, J.A.; OJEA, J.; NÓVOA-VÁZQUEZ, S. y MARTÍNEZ-PATÍÑO, D. 2009b. Primeros datos de la calidad de la puestas, en relación al estado de los reproductores de las almejas: *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum*. En: M. Rey, J. Fernández, C. Lodeiros y A. Guerra (ed). *XII Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas*. O Grove, Pontevedra, España.
- ARIAS, C. R.; MACIÁN, M. C.; AZNAR, R.; GARAY, E. y PUJALTE, M. J. 1999. Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolates from seawater and shellfish of the western Mediterranean coast. *Journal of Applied Microbiology*, 86 125-134.
- ARMADA, S. P.; FARTO, R.; PÉREZ, M. J. y NIETO, T. P. 2003. Effect of temperature, salinity and nutrient content on the survival responses of *Vibrio splendidus* biotype I. *Microbiology*, 149 369-375.
- AUSTIN, B. 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*, 140 310-317.
- B**ARLETT, B.R. 1979. Biochemical changes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) during larval development and metamorphosis. *Proceedings of the National Shellfisheries Association*, 69: 202.
- BEAZ-HIDALGO, R.; CLEENWERCK, I.; BALBOA, S.; DE WATCHER, M.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J.; DE VOS, P. y ROMALDE, J. L. 2008. Diversity of vibrios associated with reared clams in Galicia (NW Spain). *Systematic and Applied Microbiology*, 31 215-222.
- BEIRAS, R.; CAMACHO, A.P. y ALBENTOSA, M. 1994. Influence of temperature on the physiology of growth in *Ruditapes decussatus* (L.) larvae. *Journal of Shellfish Research*, 13 (1): 77-83.
- BELLOLIO, G.; LOHRMANN, K. y DUPRE, E. 1993. Larval morphology of the scallop *Argopecten purpuratus* as revealed by scanning electron microscopy. *Veliger*, 36 (4): 332-342.

- BENINGER, P.G. y LUCAS, A. 1984. Seasonal variations in condition, reproductive activity and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Ruditapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adam & Reeve). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 79. 19-37.
- BENSADOUM, A. y WEINSTEIN, D. 1976. Assay of proteins in the presence of interfering material. *Analytical Biochemistry*, 70: 241-250.
- BERTHE, F. C. J. 2005. Diseases in Mollusc Hatcheries and their Paradox in Health Management. En: P. Walker (ed). Diseases in Asian Aquaculture V: Proceedings of the Fifth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, 239-248. Asian Fisheries Society, Queensland, Australia.
- BRANDS, S.J.C. 1989-2005. Systema Naturae 2000. Amsterdam, Holanda. [<http://sn2000.taxonomy.nl/>].
- BROWN, M.R.; GARLAND, C.D.; JEFFREY, S.W.; JAMESON, I.D. y LEROI, J.M. 1993. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Applied Phycology*, 5: 285-296.
- BROWN, M.R.; JEFFREY, S.W.; VOLKMAN, J.K. y DUNSTAN, G.A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151: 315-331.
- BROWN, M.R. 2002. Nutritional value of microalgae for aquaculture. En: L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.G. Gaxiola-Cortés y N. Simoes (ed). *Avances en Nutrición Acuicola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*, 281-292. Cancún, Quintana Roo, México.
- BRUCKNER, C. G.; REHM, C.; GROSSART, H. P. y KROTH, P. G. 2011. Growth and release of extracellular organic compounds by benthic diatoms depends on interactions with bacteria. *Environmental Microbiology*, 13 (4): 1052-1063.
- CAERS, M.; COUTTEAU, P.; CURE, K.; MORALES, V.; GAJARDO, G. y SORGELOOS, P. 1999a. The Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819): II. Manipulation of the fatty acid composition and lipid content of the eggs via lipid supplementation of the broodstock diet.

- Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 123: 97-103.
- CAERS, M.; COUTTEAU, P.; CURE, K.; MORALES, V.; GAJARDO, G. y SORGELOOS, P. 1999b. The Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819): I. Fatty acid composition and lipid content of six organs. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 123: 89-96.
- CAERS, M.; COUTTEAU, P. y SORGELOOS, P. 1999c. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different feeding rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. *Aquaculture*, 170 (3-4): 307-322.
- CAERS, M.; COUTTEAU, P. y SORGELOOS, P. 2000. Incorporation of different fatty acids, supplied as emulsions or liposomes, in the polar and neutral lipids of *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture*, 186 (1-2): 157-171.
- CANNUEL, R.; BENINGER, P.G.; MCCOMBIE, H. y BOUDRY, P. 2009. Gill development and its functional and evolutionary implications in the blue mussel *Mytilus edulis* (Bivalvia: Mytilidae). *Biological Bulletin*, 217 (2): 173-188.
- CANO-GÓMEZ, A.; GOULDEN, E. F.; OWENS, L. y HOJ, L. 2010. *Vibrio owensii* sp. nov., isolated from cultured crustaceans in Australia. *FEMS Microbiology Letters*, 302 (2): 175-181.
- CARRIKER, M.R. 2001. Embryogenesis and organogenesis of veligers and early juveniles. En: J.N. Kraeuter y M. Castagna (ed). *Biology of the Hard Clam*, 77-115. Elsevier Science B.V. Amsterdam, Holanda.
- CASSE, N.; DEVAUCHELLE, N. y LE PENNEC, M. 1998. Embryonic shell formation in the scallop *Pecten maximus* (Linnaeus). *Veliger*, 41 (2): 133-141.
- CERVIÑO-OTERO, A.; DA COSTA, F.; OJEA, J.; NÓVOA-VÁZQUEZ, S. y MARTÍNEZ-PATÍÑO, D. 2009. Desarrollo embrionario y larvario de la almeja babosa *Venerupis pullastra* al microscopio electrónico de barrido. En: D. Beaz, M. Villaroel y S. Cárdenas (ed). *XII Congreso Nacional de Acuicultura*, 536-537. Madrid, España.

- CERVIÑO-OTERO, A. 2011. Ciclo reproductivo, cultivo en criadero y en el medio natural de la almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803). *Tesis doctoral*, Universidad de Santiago de Compostela. 288 p.
- CERVIÑO-OTERO, A.; ARANDA-BURGOS, J.A.; NÓVOA-VÁZQUEZ, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ-PATÍÑO, D. 2011. Primeras experiencias de cultivo en criadero de la almeja rubia, *Venerupis rhomboides* (Pennant, 1777), en Galicia. En: Fundación OESA, M. Villaroel, L. Reig y C. Almansa (ed). *XIII Congreso Nacional de Acuicultura*. Barcelona, España.
- COLWELL, R. R. y LISTON, J. 1960. Microbiology of shellfish. Bacteriological study of the natural flora of pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Applied Microbiology*, 8 (2): 104-109.
- COUTTEAU, P.; CASTELL, J.D.; ACKMAN, R.G. y SORGELOOS, P. 1996. The use of lipid emulsions as carriers for essential fatty acids in bivalves: A test case with juvenile *Placopecten magellanicus*. *Journal of Shellfish Research*, 15 (2): 259-264.
- CRAGG, S.M. 1989. The ciliated rim of the velum of larvae of *Pecten maximus* (Bivalvia: Pectinidae). *Journal of Molluscan Studies*, 55: 497-508.
- CRAGG, S.M. y CRISP, D.J. 1991. The biology of scallop larvae. En: S.E. Shumway (ed). *Scallops: Biology, ecology and aquaculture*, 75-132. Science B.V. Amsterdam, Holanda.
- CHANCELEY, P.E. 1968. Larval development in the class Bivalvia. *Marine Biological Association of India Symposium on Mollusca*, 475-481.
- CHAPARRO, O.R.; THOMPSON, R.J. y EMERSON, C.J. 1999. The velar ciliature in the brooded larva of the chilean oyster *Ostrea chilensis* (Philippi, 1845). *Biological Bulletin*, 197 (1): 104-111.
- CHRISTIE, W.W. 1982. The structure, chemistry and occurrence of lipids. En: R. Maxwell (ed). *Lipid analysis*, 1-16. Pergamon Press, Oxford, Reino Unido.
- CHU, F.L.E. y GREAVES, J. 1991. Metabolism of palmitic, linoleic, and linolenic acids in adult oysters, *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*, 110 (2): 229-236.

DA COSTA, F.; DARRIBA, S. y MARTÍNEZ-PATÍÑO, D. 2008. Embryonic and larval development of *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) (Bivalvia: Pharidae). *Journal of Molluscan Studies*, 74: 103-109.

DA COSTA, F. 2009. Optimización del cultivo en criadero de navaja (*Ensis arcuatus* Jeffreys, 1865), longueirón (*E. siliqua* Linneo, 1758) y longueirón vello (*Solen marginatus* Pennánt, 1777): composición bioquímica y de ácidos grasos en los desarrollos larvarios. *Tesis doctoral*, Universidad de Santiago de Compostela. 336 p.

DA COSTA, F.; ARANDA-BURGOS, J.A.; CERVÍÑO-OTERO, A.; NÓVOA-VÁZQUEZ, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ-PATÍÑO, D. 2011. Desarrollo embrionario de *Ensis siliqua* con microscopía electrónica de barrido y transmisión: estudio de la formación de la concha. En: Fundación OESA, M. Villaroel, L. Reig y C. Almansa (ed). *XIII Congreso Nacional de Acuicultura*. Barcelona, España.

DA COSTA, F.; NÓVOA, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ-PATÍÑO, D. 2011. Changes in biochemical and fatty acid composition of the razor clam *Solen marginatus* (Solenidae: Bivalvia) during larval development. *Marine Biology*, 158 (8): 1829-1840.

DA COSTA, F.; NÓVOA, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ-PATÍÑO, D. 2012. Effects of algal diets and starvation on growth, survival and fatty acid composition of *Solen marginatus* (Bivalvia: Solenidae) larvae. *Scientia Marina*, 76: 527-537.

DA COSTA, F.; ARANDA-BURGOS, J. A.; CERVÍÑO-OTERO, A.; FERNÁNDEZ-PARDO, A.; LOUZÁN, A.; NÓVOA, S.; OJEA, J. y MARTÍNEZ-PATÍÑO, D. 2012. Clam hatchery and nursery culture. En: F. da Costa (ed). *Clam fisheries and aquaculture*, 2008 Nova Science Publishers, Inc.,

DE PAUW, N. y PERSONE, G. 1988. Microalgae for aquaculture. En: M.A. Borowitzka y L.J. Borowitzka (ed). *Microalgal Biotechnology*, 197-221. Cambridge, Cambridge U.P.

- DELAUNAY, F.; MARTY, Y.; MOAL, J. y SAMAIN, J.F. 1992. Growth and lipid class composition of *Pecten maximus* larvae grown under hatchery conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 163 (2): 209-219.
- DELAUNAY, F.; MARTY, Y.; MOAL, J. y SAMAIN, J.F. 1993. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 173 (2): 163-179.
- DINAMANI, P. 1974. Embryonic and larval development in the new zealand rock oyster, *Crassostrea glomerata* (Gould). *The Veliger*, 15 (4): 295-299.
- DUBERT, J.; ARANDA-BURGOS, J. A.; OJEA, J.; BARJA, J. L. y PRADO, S. 2017. Mortality event involving larvae of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* in a hatchery: isolation of the pathogen *Vibrio tubiashii* subsp. *europaeus*. *Journal of Fish Diseases*,
- DUBERT, J.; NELSON, D. R.; SPINARD, E. J.; KESSNER, L.; GÓMEZ-CHIARRI, M.; DA COSTA, F.; PRADO, S. y BARJA, J. L. 2016a. Following the infection process of vibriosis in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) larvae through GFP-tagged pathogenic *Vibrio* species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 133 27-33.
- DUBERT, J.; OSORIO, C. R.; PRADO, S. y BARJA, J. L. 2016b. Persistence of antibiotic resistant *Vibrio* spp. in shellfish hatchery environment. *Microbial Ecology*, 72 851-860.
- DUFOUR, S.C. y BENINGER, P.G. 2001. A functional interpretation of cilia and mucocyte distributions on the abfrontal surface of bivalve gills. *Marine Biology*, 138 (2): 295-309.
- DUNSTAN, G.A.; VOLKMAN, J.K.; BARRETT, S.M. y GARLAND, C.D. 1993. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *Journal of Applied Phycology*, 5: 71-83.

- EILER, A.; GONZÁLEZ-REY, C.; ALLEN, S. y BERTILSSON, S. 2007. Growth response of *Vibrio cholerae* and other *Vibrio* spp., to cyanobacterial dissolved organic matter and temperature in brackish water. *FEMS Microbiology Ecology*, 60 (3): 411-418.
- EILER, A.; JOHANSSON, M. y BERTILSSON, S. 2006. Environmental influences on *Vibrio* populations in northern temperate and boreal coastal waters (Baltic and Skagerrak Seas). *Applied and Environmental Microbiology*, 72 6004-6011.
- ELSTON, R. A.; HASEGAWA, H.; HUMPHREY, K. L.; POLYAK, I. K. y HÄSE, C. C. 2008. Reemergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Diseases of Aquatic Organisms*, 82 119-134.
- ENRIGHT, C.T.; NEWKIRK, G.F.; CRAIGIE, J.S. y CASTELL, J.D. 1986a. Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros calcitrans* Schütt of varied chemical composition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 96: 15-26.
- ENRIGHT, C.T.; NEWKIRK, G.F.; CRAIGIE, J.S. y CASTELL, J.D. 1986b. Evaluation of phytoplankton as diet for juvenile *Ostrea edulis* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 96: 1-13.
- EPIFANIO, C.E. 1976. Culture of bivalve molluscs in recirculating systems: Nutritional requirements. En: K.S. Price, W. Shaw y K. Dunberg (ed). *Proceeding of the First International Conference on Aquaculture Nutrition*, 173-194. Newark, Delaware, USA.
- ESTES, R. M.; FRIEDMAN, C. S.; ELSTON, R. A. y HERWIG, R. P. 2004. Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 58 (2-3): 223-230.
- EYSTER, L.S. y MORSE, M.P. 1984. Early shell formation during molluscan embryogenesis, with new studies on the surf clam, *Spisula solidissima*. *American Zoologist*, 24 (4): 871-882.
- EYSTER, L.S. 1986. Shell inorganic composition and onset of shell mineralization during bivalve and gastropod embryogenesis. *Biological Bulletin*, 170 (2): 211-231.

- FARÍAS, A.; URIARTE, I. y CASTILLA, J.C. 1998. A biochemical study of the larval and postlarval stages of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture*, 166: 37-47.
- FARÍAS, A. y URIARTE, I. 2001. Effect of microalgae protein on the gonad development and physiological parameters for the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Journal of Shellfish Research*, 20: 97-105.
- FARRAR, S. 1975. Low risk oyster culture in Spain. *Fish Farming International*, 2: 29-39.
- FERNÁNDEZ-PARDO, A. 2011. Cultivo de fitoplancton en sistema continuo. Evaluación del efecto de distintos parámetros. *Trabajo Fin de Máster*, Universidad de A Coruña. 29 p.
- FERNÁNDEZ-REIRIZ, M.J.; LABARTA, U.; ALBENTOSA, M. y PÉREZ-CAMACHO, A. 1999. Lipid profile and growth of the clam spat, *Ruditapes decussatus* (L), fed with microalgal diets and cornstarch. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology*, 124 (3): 309-318.
- FERNÁNDEZ-REIRIZ, M.J.; LABARTA, U.; ALBENTOSA, M. y PÉREZ-CAMACHO, A. 2006. Lipid composition of *Ruditapes philippinarum* spat: Effect of ration and diet quality. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 144 (2): 229-237.
- FERNÁNDEZ-REIRIZ, M.J.; PÉREZ-CAMACHO, A.; PETEIRO, L.G.; y LABARTA, U. 2011. Growth and kinetics of lipids and fatty acids of the clam *Venerupis pullastra* during larval development and postlarvae. *Aquaculture Nutrition*, 17: 13-23.
- FRAGA, F. 1956. Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de la antrona. *Investigación Pesquera*, III: 69-74.
- FRANZÉN, Å. 1955. Comparative morphological investigations into the spermiogenesis among Mollusca. *Zoologiska Bidrag fran Uppsala*, 30: 399-465.
- FRANZÉN, Å. 1956. On spermiogenesis, morphology of the spermatozoon and biology of fertilization among invertebrates. *Zoologiska Bidrag fran Uppsala*, 31: 355-482.

FRANZÉN, Å. 1983. Ultrastructural studies of spermatozoa in three bivalve species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitive spermatozoa. *Gamete Research*, 7 (3): 199-214.

GALLAGER, S.M. y MANN, R. 1986. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture*, 56: 105-121.

GALLAGER, S.M.; MANN, R. y SASAKI, G.C. 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalves. *Aquaculture*, 56: 81-103.

GARNIER, M.; LABREUCHE, Y.; GARCÍA, C.; ROBERT, M. y NICOLAS, J. L. 2007. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial Ecology*, 53 (2): 187-196.

GAY, M.; BERTHE, F. C. J. y LE ROUX, F. 2004a. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 59 (1): 49-56.

GAY, M.; RENAULT, T.; PONS, A. M. y LE ROUX, F. 2004b. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: Taxonomy and host alterations. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62 (1-2): 65-74.

GERARD, A. 1978. Recherches sur la variabilité de diverses populations de *Ruditapes decussatus* et *Ruditapes philippinarum* (Veneridae, Bivalvia). *Tesis doctoral*, Université de Bretagne Occidentale, 149 p.

GHARBI, A.; CHATTI, N.; SAID, K. y WORMHOUDT, A. 2010. Genetic variation and population structure of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* along the Tunisian coast inferred from mtDNA and ITS1 sequence analysis. *Biologia*, 65 (4): 688-696.

GÓMEZ-LEÓN, J.; VILLAMIL, L.; LEMOS, M. L.; NÓVOA, B. y FIGUERAS, A. 2005. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (1): 98-104.

- GÓMEZ-LEÓN, J.; VILLAMIL, L.; SALGER, S. A.; SALLUM, R. H.; REMACHA-TRIVIÑO, A.; LEAVITT, D. F. y GÓMEZ-CHIARRI, M. 2008. Survival of eastern oyster *Crassostrea virginica* from three lines following experimental challenge with bacterial pathogens. *Diseases of Aquatic Organisms*, 79 (2): 95-105.
- GONZÁLEZ-ARAYA, R.; LEBRUN, L.; QUÉRÉ, C. y ROBERT, R. 2012. The selection of an ideal diet for *Ostrea edulis* (L.) broodstock conditioning (part B). *Aquaculture*, 362 55-66.
- GRASSÉ, P.P. 1985. Tomo 1. Invertebrados. En: P.P. Grassé, R.A. Poisson y O. Tuzet (ed). *Zoología*. Masson, S.A.
- GROS, O.; FRENKIEL, L. y MOUEZA, M. 1997. Embryonic, larval, and post-larval development in the symbiotic clam *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebrate Biology*, 116 (2): 86-101.
- GROS, O.; DUPLESSIS, M.R. y FELBECK, H. 1999. Embryonic development and endosymbiont transmission mode in the symbiotic clam *Lucinoma aequizonata* (Bivalvia : Lucinidae). *Invertebrate Reproduction and Development*, 36 (1-3): 93-103.
- GWO, J.C.; YANG, W.T.; SHEU, Y.T. y CHENG, H.Y. 2002. Spermatozoan morphology of four species of bivalve (Heterodonta, Veneridae) from Taiwan. *Tissue and Cell*, 34 (1): 39-43.
- HADA, H. S.; WEST, P.; LEE, J. V.; STEMMLER, J. y COLWELL, R. R. 1984. *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve mollusks. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34 (1): 1-4.
- HAWS, M.C.; DIMICHELE, L. y HAND, S.C. 1993. Biochemical changes and mortality during metamorphosis of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 2: 207-217.
- HELM, M.M.; HOLLAND, D.L. y STEPHENSON, R.R. 1973. The effect of supplementary algal feeding of a hatchery and breeding stock of *Ostrea edulis* L.

- on larval vigour. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 53: 673-684.
- HELM, M.M. y BOURNE, N. 2004. Hatchery Culture of Bivalves. A Practical Manual. *FAO Fisheries Technical Paper No. 471*. FAO, Roma. 177 p.
- HENDRIKS, I.E.; VAN DUREN, L.A. y HERMAN, P.M.J. 2003. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on reproductive output and larval growth of bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 296 (2): 199-213.
- HESS, H.H.; LEES, J.E. y DERR, J.E. 1978. A linear Lowry-Folin assay for both water-soluble and sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins. *Analytical Biochemistry*, 85: 259-300.
- HODGSON, C.A. y BURKE, R.D. 1988. Development and Larval Morphology of the Spiny Scallop, *Chlamys hastata*. *Biological Bulletin*, 174 (3): 303-318.
- HOLBACH, M.; ROBERT, R.; BOUDRY, P.; PETTON, B.; ARCHAMBAULT, P. y TREMBLAY, R. 2015. Scallop larval survival from erythromycin treated broodstock after conditioning without sediment. *Aquaculture*, 437 312-317.
- HOLLAND, D.L. y SPENCER, B.E. 1973. Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* (L.) during larval development, metamorphosis and early spat growth. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 53: 287-298.
- HOLLAND, D.L. 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. En: D.C. Malins y J.R. Sargent (ed). *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology* 4, 85-123. Academic Press, Londres, Reino Unido.
- HOWARD, R.W. y STANLEY, D.W. 1999. The tie that binds: Eicosanoids in invertebrate biology. *Annals of the Entomological Society of America*, 92: 880-890.
- HUQ, A.; SACK, R. B.; NIZAM, A.; LONGINI, I. M.; NAIR, G. B.; ALI, A.; MORRIS, J. G.; KHAN, M. N.; SIDDIQUE, A. K.; YUNUS, M.; ALBERT, M. J.; SACK, D. A. y COLWELL, R. R. 2005. Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 4645-4654.

- IWATA, K. S. 1952. Spawning of *Mytilus edulis*. *Bulletin of Tohoku Regional Fisheries Research Laboratory*, 3-4 (n° 28, 29 y 50).
- JOSEPH, J.D. 1982. Lipid composition of marine and estuarine invertebrates. Part II: Mollusca. *Progress in Lipid Research*, 21: 109-153.
- KANG, D.H.; KIM, S.J. y CHOI, K.S. 2004. Microscopic observations of larval *Ostrea circumpicta* (Bivalve : Ostreidae) in brood chambers. *Journal of Shellfish Research*, 23 (2): 411-415.
- KIM, W.S.; HUH, H.T.; LEE, J.H.; RUMOHR, H. y KOH, C.H. 1999. Endogenous circatidal rhythm in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). *Marine Biology*, 134 (1): 107-112.
- KIM, O. S.; CHO, Y. J.; LEE, K.; YOON, S. H.; KIM, M.; NA, H.; PARK, S. C. y JEON, Y. S. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62 716-721.
- KLINGENSMITH, J. 1982. Distribution of methylene and nonmethylene-interrupted dienoic fatty acids in polar lipids and triacylglycerols of selected tissues of the hardshell clam (*Mercenaria mercenaria*). *Lipids*, 17: 976-981.
- KNIPRATH, E. 1980. Larval development of the shell and shell gland in *Mytilus* (Bivalvia). *Wilhelm Roux Archives of Developmental Biology*, 188 (3): 201-204.
- KRAFFE, E.; SOUDANT, P. y MARTY, Y. 2004. Fatty acids of serine, ethanolamine, and choline plasmalogens in some marine bivalves. *Lipids*, 39 (1): 59-66.
- KREEGER, D.A. y LANGDON, C.J. 1993. Effect of dietary protein content on growth of juvenile mussels, *Mytilus trossulus* (Gould, 1850). *Biological Bulletin*, 185: 123-139.

- L** AING, I. y MILLICAN, P.F. 1986. Relative growth and growth efficiency of *Ostrea edulis* spat fed various algal diets. *Aquaculture*, 54 (4): 245-262.
- LAING, I.; CHILD, A.R. y JANKE, A. 1990. Nutritional value of dried algae diets for larvae of Manila clam (*Tapes philippinarum*). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 70 (1): 1-12.
- LANGDON, C.J. y WALDOCK, M.J. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 61 (2): 431-448.
- LANGDON, C.J. 1982. Growth studies with bacteria-free oyster (*Crassostrea gigas*) larvae fed on semi-defined artificial diets. *Biological Bulletin*, 164: 227-235.
- LARUELLE, F.; GUILLOU, J. y PAULET, Y.M. 1994. Reproductive pattern of the clams, *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* on intertidal flats in Brittany. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 74 (2): 351-366.
- LEBOUR, M.V. 1971. Notes on the breeding of some Lamellibranchs from Plymouth and their larvae. En: D.P. Costello y C. Henley (ed). *Methods for obtaining and handling marine eggs and embryos*, 119-144. Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, USA.
- LEE, R.F. 1991. Lipoproteins from the hemolymph and ovaries of marine invertebrates. En: R. Gille (ed). *Advances in comparative and environmental physiology* 7, 187-208. Editorial Springer-Verlag, Londres, Reino Unido.
- LIN, D.S.; CONNOR, W.E. y SPENLER, C.W. 1993. Are dietary saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids deposited to the same extent in adipose tissue of rabbits? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 58: 174-179.
- LODEIROS, C.; BOLINCHES, J.; DOPAZO, C. y TORANZO, A. 1987. Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture*, 65 15-29.
- LOOSANOFF, V.L. y DAVIS, H.C. 1963. Rearing of bivalve mollusks. En: F.S. Russell (ed). *Advances in Marine Biology*, 1: 1-136.

- LOOSANOFF, V.L.; DAVIS, H.C. y CHANLEY, P.E. 1966. Dimensions and shapes of larvae of some marine bivalve mollusks. *Malacologia*, 4 (2): 351-435.
- LOUIS, V. R.; RUSSEK-COHEN, E.; CHOOPUN, N.; RIVERA, I. N.; GANGLE, B.; JIANG, S. C.; RUBIN, A.; PATZ, J. A.; HUQ, A. y COLWELL, R. R. 2003. Predictability of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 2773-2785.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. y RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin fenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1): 265-275.
- MAHOU, X.M. 2008. Implementación y gobernanza: La política de marisqueo en Galicia. *Monografías*, 13. Xunta de Galicia, España.
- MAKRIDIS, P.; FERREIRA, T.; KOKOU, F.; TSIGENOPOUOS, C. S. y DIVANACH, P. 2012. Quantitative and qualitative aspects of bacterial communities associated with cultures of *Chlorella minutissima*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43 (4): 571-578.
- MANAHAN, D.T. y CRISP, D.J. 1982. The role of dissolved organic material in the nutrition of pelagic larvae: amino acid uptake by bivalve veligers. *Integrative and Comparative Biology*, 22: 635-646.
- MARSH, J.B. y WEINSTEIN, D.B. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research*, 7 (4): 574-576.
- MARSHALL, R.; MCKINLEY, S. y PEARCE, C. M. 2010. Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Reviews in Aquaculture*, 2 (1): 33-55.
- MARTEL, A.; HYNES, T.M. y BUCKLANDNICKS, J. 1995. Prodissoconch morphology, planktonic shell growth, and site at metamorphosis in *Dreissena polymorpha*. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie*, 73 (10): 1835-1844.
- MARTÍNEZ-PATIÑO, D.; NÓVOA-VÁZQUEZ, S. y OJEA, J. 2001. Cultivo larvario y postlarvario de almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja babosa (*Venerupis*

- senegalensis*) en criadero. En: A. Cerviño, A. Guerra y C. Pérez-Acosta (ed). *Actas del VIII Congreso Nacional de Acuicultura*, 304-306. Santander, España.
- MARTÍNEZ-PATIÑO, D.; CERVIÑO-OTERO, A.; LOUZÁN, A.; DA COSTA, F.; OJEA, J. y NÓVOA, S. 2008. Producción de especies de interés marisquero en la Planta de Cultivos de Ribadeo (CIMA). En: C. Lodeiros, J. Alió, L. Freites, N. González, A. Guerra y M. Rey. *II Foro Iberoamericano de los recursos marinos y la acuicultura (FIRMA)*, 629-634. Cumaná, Venezuela.
- MARTY, Y.; DELAUNAY, F.; MOAL, J. y SAMAIN, J.F. 1992. Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 163: 221-234.
- MATIAS, D.; JOAQUIM, S.; LEITAO, A. y MASSAPINA, C. 2009. Effect of geographic origin, temperature and timing of broodstock collection on conditioning, spawning success and larval viability of *Ruditapes decussatus* (Linn., 1758). *Aquaculture International*, 17 (3): 257-271.
- MATIAS, D.; JOAQUIM, S.; RAMOS, M.; SOBRAL, P. y LEITÃO, A. 2011. Biochemical compounds' dynamics during larval development of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758): effects of mono-specific diets and starvation. *Helgoland Marine Research*, 65 (3): 369-379.
- MCPHEARSON, R. M.; DEPAOLA, A.; ZYWNO, S. R.; MOTES, M. L. y GUARINO, A. M. 1991. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. *Aquaculture*, 99 203-211.
- METCALFE, L.D. y SCHMITZ, A.A. 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*, 33 (3): 363-364.
- MILKE, L.M.; BRICELJ, V.M. y PARRISH, C.C. 2008. Biochemical characterization and nutritional value of three *Pavlova* spp. in unialgal and mixed diets with *Chaetoceros muelleri* for postlarval sea scallops, *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture*, 276 (1-4): 130-142.
- MIRANDA, C. D.; ROJAS, R.; ABARCA, A. y HURTADO, L. 2013. Effect of florfenicol and oxytetracycline treatments on the intensive larval culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture Research*, 45 16-30.

- MOOR, B. 1983. Organogenesis. En: N.H. Verdonk, J.A.M. van den Biggelaar y A.S. Tompa (ed). *The Mollusca*, 3: 123-177. Development, Academia Press, New York, USA.
- MOUËZA, M. y FRENKIEL, L. 1995. Ultrastructural study of the spermatozoon in a tropical lucinid bivalve: *Codakia orbicularis* L. *Invertebrate Reproduction and Development*, 27 (3): 205-212.
- MOUËZA, M.; GROS, O. y FRENKIEL, L. 1999. Embryonic, larval and postlarval development of the tropical clam, *Anomalocardia brasiliana* (Bivalvia, Veneridae). *Journal of Molluscan Studies*, 65: 73-88.
- MOUËZA, M.; GROS, O. y FRENKIEL, L. 2006. Embryonic development and shell differentiation in *Chione cancellata* (Bivalvia, Veneridae): an ultrastructural analysis. *Invertebrate Biology*, 125 (1): 21-33.
- MULLER-FEUGA, A. 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology*, 12: 527-534.
- NAKAMURA, M.T. y NARA, T.Y. 2004. Structure, function and dietary regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$ and $\Delta 9$ desaturases. *Annual Review of Nutrition*, 24: 345-376.
- NAPOLITANO, G.E.; RATNAYAKE, W.M.N. y ACKMAN, R.G. 1988. Fatty acid components of larval *Ostrea edulis* (L.): importance of triacylglycerols as a fatty acid reserve. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 90 (4): 875-883.
- NEVEJAN, N.; SAEZ, I.; GAJARDO, G. y SORGELOOS, P. 2003. Supplementation of EPA and DHA emulsions to a *Dunaliella tertiolecta* diet: effect on growth and lipid composition of scallop larvae, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture*, 217 (1-4): 613-632.
- NICOLAS, J. L.; CORRE, S. y COCHARD, J. C. 2004. Bacterial population association with phytoplankton cultured in a bivalve hatchery. *Microbial Ecology*, 48 400-413.
- NOGUEROLA, L. y BLANCH, A. R. 2008. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. *Journal of Applied Microbiology*, 105 175-185.

NÓVOA, S.; MARTÍNEZ, D.; OJEA, J.; SOUDANT, P.; SAMAIN, J.-F.; MOAL, J. y RODRÍGUEZ, J.-L. 2002. Ingestion, digestion and assimilation of gelatin-acacia microcapsules incorporating deuterium-labeled arachidonic acid by larvae of the clam *Venerupis pullastra*. *Journal of Shellfish Research*, 21 (2): 649-658.

NÓVOA-VÁZQUEZ, S. 2007. Metabolismo lipídico, ácidos grasos en el cultivo larvario de almeja babosa, *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803). "Calidad ovocitaria, larvaria y nutricional con una aproximación al uso de la microencapsulación lipídica". *Tesis Doctoral*, Universidad de Santiago de Compostela. 244 p.

OCKELMANN, K.W. 1965. Developmental types in marine bivalves and their distribution along the Atlantic coast of Europe. En: L.R. Cox and J.F. Peake (ed). *Proc. 1st Europ. Malac. Congr.* 25-35. Conchological Society of Great Britain and Ireland and the Malacological Society of London.

ODUM, H.T. y ODUM, E.C. 1976. Energy basis for man and nature. *First Edition*. McGraw-Hill. New York, USA.

OJEA, J.; PAZOS, A. J.; MARTÍNEZ, D.; NÓVOA, S.; GARCÍA-MARTÍNEZ, P.; SÁNCHEZ, J. L. y ABAD, M. 2008. Effects of temperature regime on broodstock conditioning of *Ruditapes decussatus*. *Journal of Shellfish Research*, 27 (5): 1093-1100.

OJEA, J. 2013. Estudio del desarrollo gametogénico de la almeja fina, *Ruditapes decussatus*, en el medio natural y optimización de las condiciones del acondicionamiento en criadero. *Tesis doctoral*, Universidad de Santiago de Compostela. 160 p.

PAILLARD, C.; LE ROUX, F. y BORREGO, J. J. 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquatic Living Resources*, 17 (4): 477-498.

PALACIOS, E.; RACOTTA, I.S.; KRAFFE, E.; MARTY, Y.; MOAL, J. y SAMAIN, J.-F. 2005. Lipid composition of the giant lion's-paw scallop (*Nodipecten*

- subnodosus*) in relation to gametogenesis: I. Fatty acids. *Aquaculture*, 250 (1-2): 270-282.
- PARACHE, A. 1982. La palourde. *La Pêche Maritime*, 20: 496-507.
- PARADIS, M. y ACKMAN, R.G. 1977. Potential for employing the distribution of anomalous non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in several marine invertebrates as part of food web studies. *Lipids*, 12 (2): 170-176.
- PÉREZ-CAMACHO, A.; ROMAN, G. y TORRE-CERVIGÓN, M. 1977. Experiencias en cultivos de larvas de tres especies de moluscos bivalvos: *Venerupis pullastra* (Montagu), *Venerupis decussata* (Linnaeus) y *Ostrea edulis* (Linnaeus). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, 235: 215-267.
- PÉREZ-CAMACHO, A. 1980. Biología de *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) y *Venerupis decussata* (Linné, 1767) (mollusca, bivalvia), con especial referencia a los factores determinantes de la producción. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, 5 (4): 43-76.
- PÉREZ-CAMACHO, A.; ALBENTOSA, M.; FERNÁNDEZ-REIRIZ, M.J. y LABARTA, U. 1998. Effect of microalgal and inert (cornmeal and cornstarch) diets on growth performance and biochemical composition of *Ruditapes decussatus* seed. *Aquaculture*, 160 (1-2): 89-102.
- PERNET, F.; TREMBLAY, R.; DEMERS, E. y ROUSSY, M. 2003. Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system. *Aquaculture*, 221 (1-4): 393-406.
- PERNET, F. y TREMBLAY, R. 2004. Effect of varying levels of dietary essential fatty acid during early ontogeny of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 310 (1): 73-86.
- PERNET, F.; BRICELJ, V.M. y PARRISH, C.C. 2005. Effect of varying dietary levels of omega 6 polyunsaturated fatty acids during the early ontogeny of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 327 (2): 115-133.
- PERSOONE, G. y CLAUS, C. 1980. Mass culture of algae: a bottleneck in the nursery culturing of molluscs. En: G.S.C.J. Shoeder (ed). *Algae Biomass*, 265-285. Elsevier. Amsterdam, Holanda.

- PETTERSEN, A.K.; TURCHINI, G.M.; JAHANGARD, S.; INGRAM, B.A. y SHERMAN, C.D.H. 2010. Effects of different dietary microalgae on survival, growth, settlement and fatty acid composition of blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*) larvae. *Aquaculture*, 309 (1-4): 115-124.
- PIRINI, M.; MANUZZI, M.P.; PAGLIARANI, A.; TROMBETTI, F.; BORGATTI, A. R. y VENTRELLA, V. 2007. Changes in fatty acid composition of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) fed on microalgal and wheat germ diets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 147 (4): 616-626.
- PRADO, S.; ROMALDE, J. L.; MONTES, J. y BARJA, J. L. 2005. Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. *Diseases of Aquatic Organisms*, 67 (3): 209-215.
- PRADO, S.; DUBERT, J. y BARJA, J. L. 2014a. Characterization of pathogenic vibrios isolated from bivalve hatcheries in Galicia, NW Atlantic coast of Spain. Description of *Vibrio tubiashii* subsp. *europaeus* subsp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 38 26-29.
- PRADO, S.; DUBERT, J.; DA COSTA, F.; MARTÍNEZ-PATÍÑO, D. y BARJA, J. L. 2014b. Vibrios in hatchery cultures of the razor clam, *Solen marginatus* (Pulteney). *Journal of Fish Diseases*, 37 209-217.
- PRUZZO, C.; GALLO, G. y CANESI, L. 2005. Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environmental Microbiology*, 7 761-772.
- PUJALTE, M. J.; ORTIGOSA, M.; MACIÁN, M. C. y GARAY, E. 1999. Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oyster and seawater. *International Microbiology*, 2 259-260.
- R**ALEIGH, J. y KEEGAN, B.F. 2007. Embryonic development in the bivalve *Scrobicularia plana* (Semelidae) using scanning electron microscopy. *Invertebrate Reproduction & Development*, 50 (3): 139-144.

- REDFEARN, P. 1982. Larval shell development of the toheroa, *Paphies ventricosa* (Gray, 1843) (Mactracea: Mesodesmatidae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 16 (3-4): 241-252.
- REDFEARN, P.; CHANLEY, P. y CHANLEY, M. 1986. Larval shell development of four species of New Zealand mussels: (Bivalvia, Mytilacea). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 20 (2): 157-172.
- REDFEARN, P. 1987. Larval shell development of the northern tuatua, *Paphies subtriangulata* (Bivalvia, Mesodesmatidae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 21 (1): 65-70.
- RENAUD, S.M.; THINH, L.V. y PARRY, D.L. 1999. The gross composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, 170: 147-159.
- RICO-VILLA, B.; LE COZ, J.R.; MINGANT, C. y ROBERT, R. 2006. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 256 (1-4): 377-388.
- RIQUELME, C. E.; FUKAMI, K. y YUZABURO, L. 1987. Annual fluctuations of phytoplankton and bacterial communities in Maizuru Bay and their interrelationship. *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology*, 2 (1): 29-37.
- RIQUELME, C.; HAYASHIDA, G.; VERGARA, N.; VASQUEZ, A.; MORALES, y. y CHAVEZ, P. 1995. Bacteriology of the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) cultured in Chile. *Aquaculture*, 138 49-60.
- ROBERT, R. y TRINTIGNAC, P. 1997a. Substitues for live microalgae in mariculture: A review. *Aquatic Living Resources*, 10: 315-327.
- ROBERT, R. y TRINTIGNAC, P. 1997b. Microalgues et nutrition larvaire en éclosion de mollusques. *Haliothis*, 26: 1-13.
- RODRÍGUEZ, J. L.; SEDANO, F.J.; GARCÍA-MARTÍN, L.O.; PÉREZ-CAMACHO, A. y SÁNCHEZ, J.L. 1990. Energy metabolism of newly settled *Ostrea edulis* spat during metamorphosis. *Marine Biology*, 106: 109-111.

- RODRÍGUEZ-MOSCOSO, E. 2000. Histofisiología de la reproducción de almeja fina *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758) en la ría de Arosa (población natural y población de cultivo). *Tesis doctoral*, Universidad de Santiago de Compostela. 202 p.
- ROJAS, R.; MIRANDA, C. D.; OPAZO, R. y ROMERO, J. 2015. Characterization and pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with massive mortalities of commercial hatchery-reared larvae of scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Journal of Invertebrate Pathology*, 124 61-69.
- ROMALDE, J. L.; DIÉGUEZ, A. L.; DOCE, A.; LASA, A.; BALBOA, S.; LÓPEZ, C. y BEAZ-HIDALGO, R. 2012. Advances in the knowledge of the microbiota associated with clams from natural beds. En: F. Da Costa (ed). *Clam fisheries and aquaculture*, 163-189. Nova Science Publisher, Inc., New York.
- ROMALDE, J. L.; DIÉGUEZ, A. L.; LASA, A. y BALBOA, S. 2014. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. *Frontiers in Microbiology*, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00413>.
- S**AINZ-HERNÁNDEZ, J. C. y MAEDA-MARTÍNEZ, A. N. 2005. Sources of *Vibrio* bacteria in mollusc hatcheries and control methods: a case of study. *Aquaculture Research*, 36 1611-1618.
- SAITOU, N. y NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (4): 406-425.
- SALVENSEN, I.; REITAN, K. I.; SKJERMO, J. y OIE, G. 2000. Microbial environments in marine larviculture: impacts of algal growth rates on the bacterial load in six microalgae. *Aquaculture International*, 8 275-287.
- SANDAA, R. A.; BRUNVOLD, L.; MAGNESEN, T. y BERGH, O. 2008. Monitoring the opportunistic bacteria *Pseudoalteromonas* sp. LT-13 in a great scallop, *Pecten maximus* hatchery. *Aquaculture*, 276 14-21.
- SASTRY, A.N. 1979. Pelecypoda (excluding Osteidae). En: A.C. Giese y J.S. Pearse (ed). *Reproduction of marine invertebrates*, 113-292. Academic Press. New York, USA.

- SCHULZE, A. D.; ALABI, A. O.; TATTERSALL-SHELDRAKE, A. R. y MILLER, K. M. 2006. Bacterial diversity in marine hatchery: balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. *Aquaculture*, 256 50-73.
- SERDAR, S.; LÖK, A.; KIRTIK, A.; ACARLI, S.; KÜÇÜKDERMENCI, A.; GÜLER, M. y YIGITKURT, S. 2010. Comparison of Gonadal Development of Carpet Shell Clam (*Tapes decussatus*, Linnaeus, 1758) in Inside and Outside of Çakalburnu Lagoon, Izmir Bay. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 10 (3): 395-401.
- SHAFEE, M.S. y DAOUDI, M. 1991. Gametogenesis and spawning in the carpet-shell clam, *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia), from the Atlantic coast of Morocco. *Aquaculture and Fisheries Management*, 22: 203-216.
- SILBERFELD, T. y GROS, O. 2006. Embryonic development of the tropical bivalve *Tivela mactroides* (Born, 1778) (Veneridae: subfamily Meretricinae): a SEM study. *Cahiers De Biologie Marine*, 47 (3): 243-251.
- SMAOUI-DAMAK, W.; MATHIEU, M.; REBAI, T. y HAMZA-CHAFFAI, A. 2007. Histology of the reproductive tissue of the clam *Ruditapes decussatus* from the gulf of Gabès (Tunisia). *Invertebrate Reproduction & Development*, 50 (3): 117-126.
- SOKAL, R.R. y ROHLF, F.J. 1995. Biometry. The principles and practise of statistics in biological research. *Freeman*, New York, USA. 358 p.
- SOUDANT, P.; MOAL, J.; MARTY, Y. y SAMAIN, J.F. 1997. Composition of polar lipid classes in male gonads of *Pecten maximus* (L.): Effect of nutrition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 215 (1): 103-114.
- SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E. y ISAMBERT, A. 2006. Review: commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101: 87-96.
- SUGITA, H.; TANAAMI, H.; KOBASHI, T. y DEGUCHI, Y. 1981. Bacterial flora of coastal bivalves. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 47 655-661.
- SUGUMAR, G.; NAKAI, T.; HIRATA, Y.; MATSUBARA, D. y MUROGA, K. 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of

japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 3 111-118.

TAKEMURA, A. F.; CHIEN, D. M. y POLZ, M. F. 2014. Associations and dynamics of Vibrionaceae in the environment, from the genus to the population level. *Frontiers in Microbiology*, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00038>.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. y KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24 1596-1599.

TARDY, J. y DONGARD, S. 1993. Le complexe apical de la véligère de *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve, 1850) Mollusque Bivalve Vénéridé. *Comptes Rendus De L'Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences*, 316 (3): 177-184.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. y GIBSON, T. J. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22 4673-4680.

TRAVERS, M. A.; MERSNI-ACHOURM, R.; HAFFNERM, P.; TOURBIEZM, D.; CASSONEM, A. L.; MORGAM, B.; DOGHRIM, I.; GARCÍA, C.; RENAULT, T.; FRUITIER-ARNAUDIN, I. y SAULNIER, D. 2014. First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: I. Characterization of isolates and detection during mortality events. *Journal of Invertebrate Pathology*, 123 38-48.

TREMBLAY, R.; CARTIER, S.; MINER, P.; PERNET, F.; QUERE, C.; MOAL, J.; MUZELLEC, M.L.; MAZURET, M. y SAMAIN, J.F. 2007. Effect of *Rhodomonas salina* addition to a standard hatchery diet during the early ontogeny of the scallop *Pecten maximus*. *Aquaculture*, 262 (2-4): 410-418.

TURNER, J. W.; GOOD, B.; COLE, D. y LIPP, E. K. 2009. Plankton composition and environmental factors contribute to *Vibrio* seasonality. *ISME Journal*, 3 (9): 1082-1092.

URIARTE, I.; FARÍAS, A. y CASTILLA, J. C. 2001. Effect of antibiotic treatment during larval development of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquacultural Engineering*, 25 139-147.

URIARTE, I.; FARÍAS, A.; HERNÁNDEZ, J.; SCHÄFER, C. y SORGELOOS, P. 2004. Reproductive conditioning of Chilean scallop (*Argopecten purpuratus*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): effects of enriched diets. *Aquaculture*, 230: 349-357.

UTTING, S. D. 1986. A preliminary study on growth of *Crassostrea gigas* larvae and spat in relation to dietary protein. *Aquaculture*, 56: 123-138.

UTTING, S. D. y MILLICAN, P. F. 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*, 155 (1-4): 45-54.

UTTING, S. D. y MILLICAN, P. F. 1998. The role of diet in hatchery conditioning of *Pecten maximus* L.: a review. *Aquaculture*, 165 (3-4): 167-178.

VERDONK, N.H. y VAN DEN BIGGELAAR, J.A.M. 1983. Early development and the formation of the germ layers. En: N.H. Verdonk, J.A.M. van den Biggelaar y A.S. Tompa (ed). *The Mollusca*, 3: 91-122. Development, Academia Press, New York, USA.

VILELA, H. 1950. Vida bentónica de *Tapes decussatus* (L.). *Travaux de la Station de Biologie Maritime de Lisbonne*, 53: 1-120.

WAECHTER, M.; LE ROUX, F.; NICOLAS, J. L.; MARISSAL, E. y BERTHE, F. C. J. 2002. Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas*. *Comptes Rendus Biologies*, 325 (3): 231-238.

WALDOCK, M.J. y HOLLAND, D.L. 1984. Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 19 (5): 332-336.

- WALLER, T.R. 1981. Functional morphology and development of veliger larvae of the European oyster, *Ostrea edulis* Linne. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 328: 1-70.
- WASSNIG, M. y SOUTHGATE, P.C. 2012. Embryonic and larval development of *Pteria penguin* (Röding, 1798) (Bivalvia: Pteriidae). *Journal of Molluscan Studies*, 78 (1): 134-141.
- WATANABE, T.; IZQUIERDO, M.S.; TAKEUCHI, T.; SATOH, S. y KITAJIMA, C. 1989. Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty-acid efficacy in larval red seabream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55 (9): 1635-1640.
- WEBB, K. L. y CHU, F. L. 1982. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. En: G. Pruder, C.J. Langdon y D.E. Conklin (ed). *Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition 2*, 272-291. Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- WEBB, K. L. y CHU, F. L. 1983. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. En: G.D. Pruder (ed). *Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*, 272-291. Spec. Publ.-World Maric. Soc.
- WHYTE, J.N.C.; BOURNE, N. y HODGSON, C.A. 1987. Assessment of biochemical composition and energy reserves in larvae of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 113: 113-124.
- WHYTE, J.N.C.; BOURNE, N. y HODGSON, C.A. 1989. Influence of algal diets on biochemical-composition and energy reserves in *Patinopecten yessoensis* (Jay) larvae. *Aquaculture*, 78 (3-4): 333-347.
- WILSON, J. H. y SEED, R. 1974. Reproduction in *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Bivalvia) in Carlingford Lough, Northern Ireland. *Irish Fisheries Investigations B*, 15 1-30.

YAN, X.; ZHANG, G. y YANG, F. 2006. Effects of diet, stocking density and environmental factors on growth, survival and metamorphosis of Manila

clam *Ruditapes philippinarum* larvae. *Aquaculture*, 253: 350-358.

ZHANG, G. y YAN, X. 2006. A new three-phase culture method for Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, farming in northern China. *Aquaculture*, 258 (1-4): 452-461.

ZHUKOVA, N.V. 1991. The pathway of the biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 100: 801-804.





Capítulo VI

Anexos: Publicaciones





Embryonic and larval development of *Ruditapes decussatus* (Bivalvia: Veneridae): a study of the shell differentiation process.

<https://doi.org/10.1093/mollus/eyt044>

Effects of microalgal diet on growth, survival, biochemical and fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* larvae.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.032>

Beneficial effects of carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) depuration during short periods of conditioning in shellfish hatchery: Role of the temperature and phytoplankton on reduction and diversity of vibrios.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.030>

